

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Innere Klinik (Tumorforschung)

**Präklinische Evaluation
des EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors „Gefitinib“
an der A 253-Zelllinie bei Kopf- und Halstumoren**

Inaugural-Dissertation
Zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Caroline Christianne Eggemann
aus Immenstadt
2006

Dekan: Herr Univ.- Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel

1. Gutachter: Herr Priv. -Doz. Dr. med. U. J. Vanhoefer

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. M. E. Scheulen

Tag der mündlichen Prüfung: 2.Mai 2007

1	Einleitung.....	6
1.1	EGF-Rezeptor Struktur und Funktion.....	10
1.2	Klinische Relevanz.....	14
1.3	Gefitinib.....	19
1.4	Zytostatika: Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Paclitaxel und Irinotecan	22
1.4.1	Cisplatin	22
1.4.2	Carboplatin.....	23
	5-Fluorouracil	23
1.4.3	Paclitaxel	24
1.4.4	Irinotecan (CPT-11)	25
1.5	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	26
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Zelllinie A253	27
2.2	Kulturtechnik	27
2.3	Wachstumskinetik	27
2.4	Technik des SRB Tests	28
2.4.1	Sulforhodamin B	28
2.4.2	Verlauf des Tests	29
2.5	Interaktionsanalysen: (Interaktion zwischen Gefitinib und anderen Zytostatika)	29
2.5.1	Versuch mit $\frac{1}{8}$ IC ₅₀ Gefitinib.....	30
2.5.2	Versuch mit $\frac{1}{4}$ IC ₅₀ Gefitinib.....	30
2.5.3	Kontrollansatz mit RPMI-Medium.....	30
2.6	Das Testprinzip des Westernblots	31
2.6.1	Proteinisolierung	31
2.6.2	Auftrennen der Proteinlösungen mittels SDS-Gelelektrophorese	32
2.6.3	Herstellen der Probe, Proteintrennung und -transfer	32
2.6.4	Immunodetektion	32
2.6.5	Auswertung mit der ECL (<i>Enhanced Chemo Luminescence</i>) - Detektion	34
2.6.6	Westernblotansätze	34
2.6.7	Übersicht über die Ansätze	34

2.6.8	Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Vorbehandlung	35
2.7	Testprinzip der Reversen Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)	35
2.7.1	RNA Isolierung.....	35
2.7.2	Messung der RNA-Konzentration	36
2.7.3	Versuchsablauf	36
2.7.4	Reverse Transkription.....	36
2.7.5	Gelelektrophorese.....	38
2.7.6	Versuch RT-PCR	38
2.7.7	Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Vorbehandlung der Zellen ...	39
2.8	Statistische Methoden.....	39
3	Ergebnisteil	41
3.1	Wachstumskinetik mit der Zelllinie A253.....	41
3.2	Zytotoxizitätstests	42
3.2.1	Cisplatin	42
3.2.2	Carboplatin.....	43
3.2.3	5-Fluorouracil	43
3.2.4	Irinotecan	44
3.2.5	Paclitaxel	44
3.2.6	Gefitinib 24h.....	45
3.2.7	Gefitinib 120h.....	46
3.2.8	Zusammenfassung	46
3.3	Interaktion von Gefitinib in subtoxischen Konzentrationen.....	47
3.3.1	Cisplatin	47
3.3.2	Carboplatin.....	49
3.3.3	5-Fluorouracil	50
3.3.4	Irinotecan (SN38).....	52
3.3.5	Paclitaxel	53
3.3.6	Zusammenfassung	55
3.4	Westernblot Ergebnisse	55
3.4.1	β -Actin-Antikörper	56
3.4.2	EGF-Rezeptor-Antikörper	56
3.5	RT-PCR-Ergebnisse	58
3.5.1	Anti- β -Actin-Primer.....	58

3.5.2	EGFR Expression	59
4	Diskussion.....	60
5	Zusammenfassung	69
6	Literatuverzeichnis	70
7	Materialnachweis	84
7.1	Chemikalien	84
7.2	Laborgeräte.....	85
8	Abbildungsverzeichnis:.....	86
9	Danksagung	88
10	Lebenslauf.....	89

1 Einleitung

In den letzten Jahren hat die Chemotherapie in der Behandlung von Kopf- und Halstumoren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Ergebnisse aus präklinischen Studien sind wichtig um festzustellen, welche Substanzen bzw. Kombinationen später in Tierversuchen und letztlich in klinischen Studien an Menschen zu prüfen sind.

Kopf- und Halstumoren sind für 5% der gesamten Tumorerkrankungen verantwortlich und haben eine jährliche Mortalität von 6/100.000 Einwohnern (USA 4/100.000, Deutschland/Schweiz 7/100.000, Frankreich 13/100.000, Israel 1.5/100.000) mit regionalen Schwankungen und einer männlichen Prädilektion von 4:1. Diese besteht unter anderem aufgrund geschlechtlich unterschiedlicher Alkohol- und Nikotingewohnheiten (78).

Nach der Lokalisation werden Tumoren der Mundhöhle und des Oropharynx, des Hypopharynx, des Larynx, der Nasennebenhöhlen, Nasopharynxkarzinome und Speicheldrüsentumoren unterschieden.

Unter den Risikofaktoren sind Alkohol- und Nikotinmissbrauch hervorzuheben (18; 71). Insbesondere deren Kombination sind für mehr als 80% der Mundhöhlen- und Larynxkarzinome verantwortlich (75). Weiterhin sind Vitaminmangel, der Genuss von salzgetrocknetem Fisch und die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus pathogenetisch mit Nasopharynxkarzinomen assoziiert (51;40;73). Weitere auf die Inzidenz wirkende Faktoren sind Tabakkauen, Mangelernährung, ungenügende Mundhygiene und die Exposition mit Holzstaub. Das Adenokarzinom ist eine anerkannte Berufskrankheit holzverarbeitender Arbeiter. Auch genetische Faktoren spielen eine Rolle für die Entwicklung von Tumoren im Kopf- und Halsbereich. Gastroösophagealer Reflux ist mit erhöhtem Auftreten von pharyngealen Karzinomen assoziiert (73).

Kopf- und Halstumoren sind zu 90% Plattenepithelkarzinome. Im Nasennebenhöhlenbereich sind Adenokarzinome häufig. Eine Sonderform ist das undifferenzierte Karzinom. Differentialdiagnostisch kommen auch Lymphome, Melanome, Sarkome sowie Metastasen in Betracht (72).

Die primäre lokoregionäre Ausdehnung und die therapeutische Tumorkontrolle bestimmen im Wesentlichen die Prognose. Die Fünfjahresüberlebensrate

schwankt stark in Abhängigkeit von den UICC-Stadien (*Union International Contre Cancer* Stadium I 75-90% und Stadium IV 10-30%).

Die Diagnostik bei Kopf- und Halstumoren dient der Bestimmung der primären Tumormanifestation, der Histologie, dem Erkennen von Fernmetastasen, dem Ausschluss von Zweittumoren (bei ca. 10% der Fälle) und der Detektion von weiteren Organerkrankungen.

Weniger als ein Drittel der Tumoren werden im Frühstadium (T1 N0, T2 N0) erkannt. Patienten in diesem Stadium haben eine gute Prognose mit einer >90%igen Fünfjahresüberlebensrate und können mittels Operation und/oder Strahlentherapie meistens geheilt werden. Rund 60% der Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnose ein intermediäres (T2 N1, T3 N0) oder lokal fortgeschrittenes (T3-4 N2-3 M0) Stadium. Von diesen Patienten können dagegen nur 30% mit Chirurgie und Strahlentherapie geheilt werden. Fernmetastasen sind bei 10% der Patienten zu finden (44). Weitere 10% entwickeln während der Progression der Tumorerkrankung Fernmetastasen (39; 22). Letztendlich findet man bei 40% der Erkrankten bei einer Autopsie post mortem Metastasen (38; 82). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen kurativ intendierter Therapie bei lokaler Tumormanifestation und palliativer Behandlung bei metastasierten Tumorleiden.

Die chirurgische Therapie sollte eine komplette Tumoresektion unter onkologischen Kriterien vorsehen. Das bedeutet histopathologisch tumorzellfreie Ränder des Resektates (R0-Resektion). Weiterhin kann im Kopf- und Halstumorbereich eine „neck dissection“ (Entnahme sämtlicher Lymphknoten im Halsbereich, mit oder ohne Entfernung des Weichteilgewebes) mit unterschiedlicher Radikalität entweder zum „*Staging*“ oder mit therapeutischer Absicht durchgeführt werden.

Die Radiatio wird an Stelle oder additiv zu chirurgischen Maßnahmen zur Verbesserung der lokoregionären Tumorkontrolle angewendet (72). Generell wird die Strahlendosis in einer hyperfraktionierten Radiotherapie appliziert, da dadurch das gesunde, regenerationsfähigere und langsamer wachsende Gewebe überproportional geschont wird, und somit die Applikation einer größeren Gesamtdosis möglich wird (72).

Die Rolle der Chemotherapie gewinnt in den Behandlungskonzepten von Kopf- und Halstumoren zunehmend an Bedeutung. Während früher die palliative Behandlung, die Behandlung von Tumorrezidiven und Metastasen im Vordergrund

stand, ist heute vor allem die Reduktion der Tumorgroße („*Downsizing*“) bei primär inoperablen Tumoren, sowie die organerhaltende Chirurgie bei Larynx und Hypopharynx-Karzinomen ein wichtiges Ziel der Chemotherapie geworden. Auch die Kombination von Radiatio und Chemotherapie im Sinne von multimodalen Therapieansätzen zeigen in klinischen Studien eine verbesserte lokoregionäre Tumorkontrolle. Umstritten ist die von Ei-Sayed et al. 1996 publizierte Metanalyse, in der eine signifikante Überlebensverlängerung und lokale Tumorkontrolle durch neoadjuvante Chemotherapie und simultane Chemotherapie gezeigt wurde (23; 48).

Standardtherapeutika im Bereich der Kopf- und Halstumoren sind Cisplatin, 5-Fluorouracil, Taxane und Methotrexat (13; 53).

Mit der Kombination von Cisplatin und 5-Fluorouracil werden im Rahmen neoadjuvanter Induktionsschemata Ansprechraten von bis zu 80% erreicht. Mit der Induktionstherapie wird vor chirurgischer Intervention durch ein intaktes Gefäßbett eine bessere Gewebeaufnahme der zytotoxischen Substanzen erreicht. Die Inzidenz von Fernmetastasen konnte so verringert und die Organerhaltung möglich gemacht werden, was bei einer sonst radikal chirurgischen Therapie nicht der Fall war (57; 61). Der Überlebensvorteil dieser multimodalen Konzepte wird von Autoren kontrovers diskutiert (25). Dass sich in großen Metaanalysen im Gegensatz zu nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen kein Überlebensvorteil für Patienten mit Kopf- und Halstumoren in den Induktionstherapie-schemata findet, kann u.U. auf zwei Phänomene zurückgeführt werden. Erstens zeigte sich im Intervall zwischen den Chemotherapiekursen im „*in vitro Assay*“ (Clonogen-Assay) von Kopf- und Halstumoren trotz guten Ansprechens eine erhöhte regenerative Reaktion der Tumorzellen. Daher ist bei simultaner Chemo- und Radiotherapie die lokoregionäre Tumorkontrolle besser als bei der alleinigen Induktionstherapie. Zweitens ist bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren die Mortalität meist vom Primärtumor abhängig und nicht von den Fernmetastasen. Eine Überlebensverlängerung durch Reduktion der Fernmetastasen ist somit schwer zu belegen (45).

Die simultane Radio-Chemotherapie auf Platinbasis gilt zur Zeit als Therapie der Wahl bei fortgeschrittenen Kopf- und Halstumoren. Diese Therapie zeigt einen deutlichen Vorteil gegenüber alleiniger Radiatio im rezidivfreien und absoluten Überleben der Patienten, ist jedoch mit einer höheren Toxizität verbunden.

Allerdings ist die Ansprechrates mit 30-35% und die Einjahresüberlebensrate mit ca. 30% nicht zufriedenstellend (11).

Dunphy et al. zeigten 2001 in einer Studie mit 62 Patienten, dass die Induktionschemotherapie mit der Kombination von Paclitaxel und Carboplatin bei fortgeschrittenen Kopf- und Halstumoren (Stadium IV) eine Ansprechrates von 66% bei guter Tolerierung aufweist. Bei 28 von 62 Patienten konnte eine Organerhaltung erreicht werden (19). Auch wenn Carboplatin als Monotherapeutikum geringere Ansprechrates als Cisplatin aufweist und weniger effektiv ist, gibt es in der Kombinationstherapie mit Paclitaxel gegenüber Cisplatin deutliche Vorteile in der Toxizität. So ist Carboplatin weniger neuro- und nephrotoxisch und ergänzt sich besser mit dem Toxizitätsprofil von Paclitaxel (33). Studien mit Docetaxel als Ergänzung zu einer Cisplatin/5-Fluorouracil-Standardinduktionschemotherapie zeigten eine höhere Ansprechrates als Cisplatin/5-Fluorouracil. Haddad et al. zeigten 2003 in einer Multizenterstudie, dass Docetaxel das Überleben von Patienten mit Kopf- und Halstumoren verbessern kann (33).

Eine Vielzahl erfolgversprechender Substanzen wie z.B. Vinorelbin und Gemcitabin werden ebenfalls in der Therapie der Kopf- und Halstumoren evaluiert.

1.1 EGF-Rezeptor Struktur und Funktion

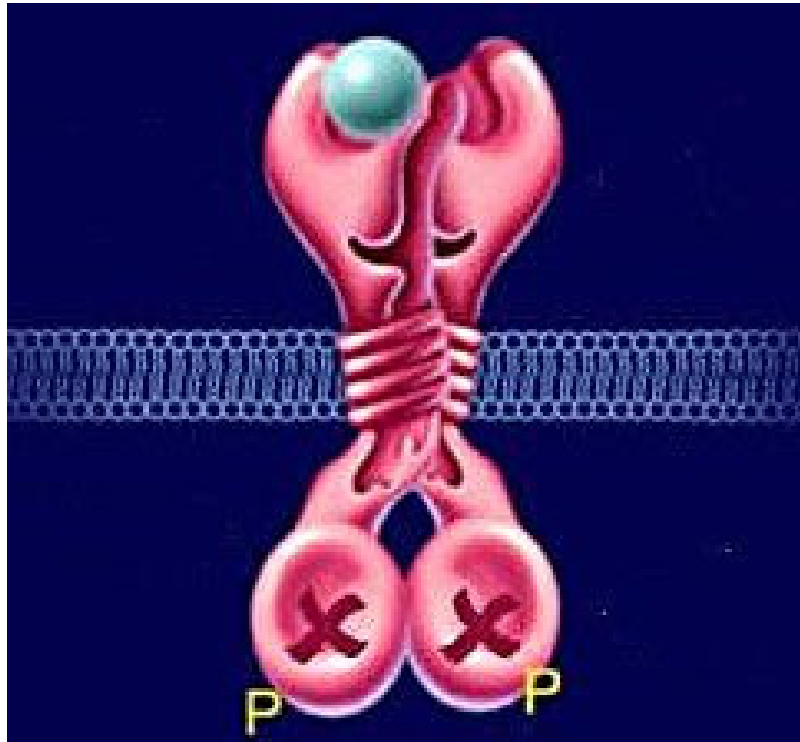


Abbildung 1: EGFR- Dimer

Der ***E*pidermal *G*rowth *F*actor *R*eceptor** (EGFR, HER1, ErbB-1) ist ein transmembraner Oberflächenrezeptor mit einem Molekulargewicht von 170kD. Sein Gen liegt auf Chromosom sieben.

EGFR war der erste von vier identifizierten Rezeptoren der ErbB-Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie (EGFR-Familie).

Auch die anderen Rezeptoren der Familie HER2, (ErbB2/neu), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4) sind wie der EGF-Rezeptor aus drei funktionalen Einheiten aufgebaut. Die extrazelluläre Domäne ist die Ligandenbindungsstelle. Die transmembrane hydrophobe Domäne dient als Membranverankerung und verbindet die extrazelluläre Einheit mit der intrazellulären Domäne, die für die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors verantwortlich ist. Mit Ausnahme des HER3-Rezeptors zeigt die Rezeptorfamilie eine hohe Ähnlichkeit in ihren Tyrosinkinasedomänen.

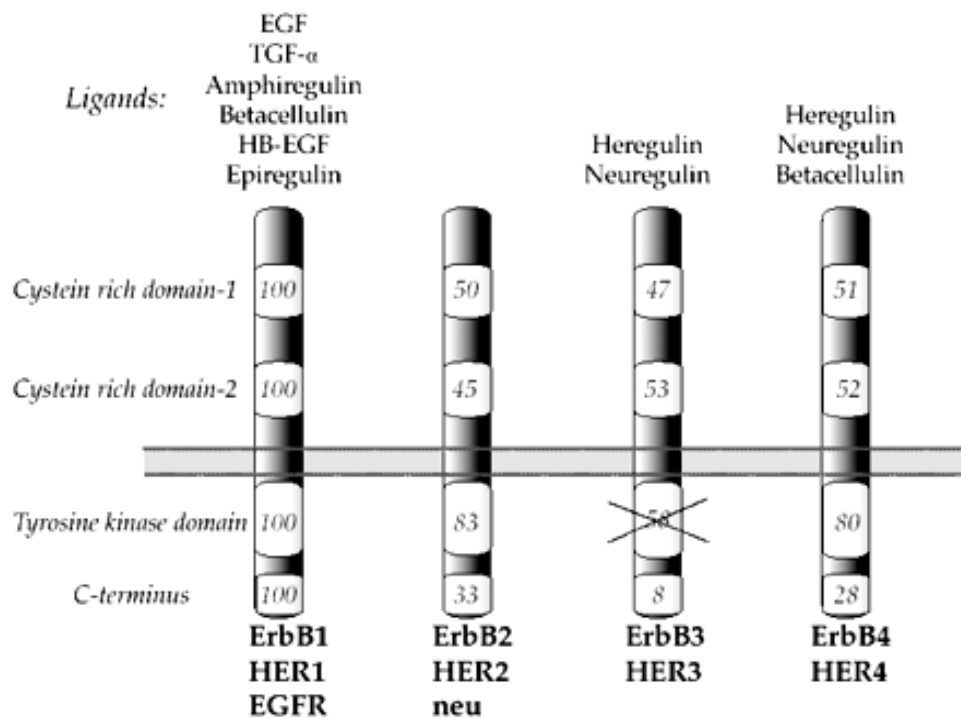


Abbildung 2: ErbB-Rezeptorfamilie nach Harari et al. (34)

Es konnte gezeigt werden, dass die folgenden sieben Proteine an den EGF-Rezeptor (ErbB1) binden können: *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor-alpha* (TGF- α), *heparin-binding EGF* (HB-EGF), Amphiregulin, Betazellulin, Epiregulin und Neuregulin G2 β (81). Bei Bindung eines Liganden an den Rezeptor kommt es zur Verdichtung der Rezeptoren und einer Homodimerisation zweier EGF-Rezeptoren oder einer Heterodimerisierung innerhalb der EGFR-Familie. Die darauf folgende Autophosphorylierung der rezeptoreigenen Tyrosinkinase führt zu Aktivierung einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen.

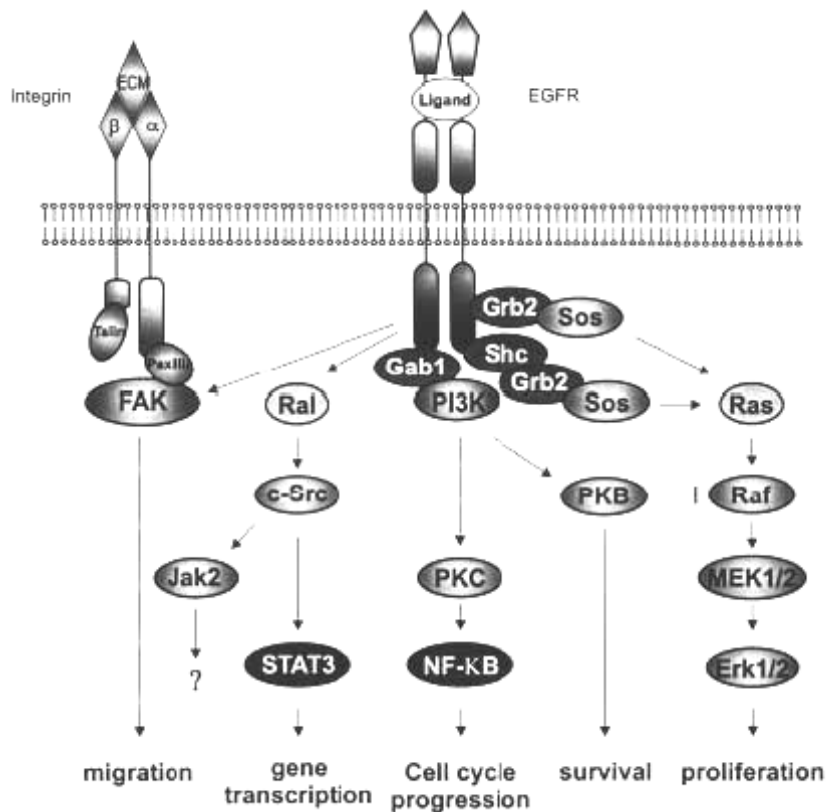


Abbildung 3: nach Prenzel et al. (2001) (60)

Über die Ankerproteine *Growth factor binding 2* (Grb2) und das *Src homology and collagen domain protein* (Shc) kommt es zur Aktivierung von Ras (G-Protein), Raf (Serin/Threonin Protein Kinase) und MAP Kinase Kinase (MEK1/2). Diese aktivieren die *extracellular signal-regulated kinase* (Erk1/2) und die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK p42/p44), welche die Zellproliferation induzieren (2). Die phosphorylierten MAPK translozieren in den Nukleus und aktivieren die Expression von Onkogenen wie z.B. fos und jun (79). Interaktionen dieser Onkogene führen zu einem Transkriptionskomplex, der mit Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, Angiogenese und Chemotaxis assoziiert wird (26). Über das Adapterprotein *Growth faktor binding 1* (Gab1) und die Aktivierung der Proteinkinase B (PKB) kommt es auf der einen Seite zur Raf-Hemmung und damit zur Hemmung der zellulären Proliferation, auf der anderen Seite hat der Signalweg über die PKB Einfluss auf das Zellüberleben. Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) kann über die Proteinkinase C (PKC) den nuklearen Transkriptionsfaktor-κB (NF-κB) aktivieren und damit Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose ausüben. Über die Kaskade Ral (GTP-ase), c-Src

(Nichtrezeptortyrosinkinase) und Signaltransduktoren und -Aktivatoren der Transkription (STAT3) wirkt der EGFR auf die Gentranskription. Die Phosphorylierung von Proteinen aus der STAT Familie führt zu einer Rezeptordimerisierung und Translokation der STAT-Proteine in den Nukleus mit nachfolgender DNA-Bindung und Regulation von Genen wie p21, WAP1 und c-fos, die in die Zellproliferation und Differenzierung involviert sind.

Die an transmembrane Integrine gebundene *Focal Adhesion Kinase* (FAK) kann ebenfalls über die EGFR-Tyrosinkinase aktiviert werden. Über diesen Weg ist der EGFR in die Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Assoziation der Integrine eingebunden und beeinflusst die Zellmigration (60).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der EGFR-Inaktivierung. Die PTP (Proteintyrosinphosphatase) dephosphoryliert die autophosphorylierten Tyrosinreste der Rezeptortyrosinkinase und stoppt damit die Tyrosinkinasefunktion des Rezeptors.

Der EGFR wird nach Ligandenbindung als Homo- oder Heterodimer in „coated pits“, das sind Clathrin ummantelte Vesikel, zellulär lokalisiert. Intrazellulär wird der Ligand-Rezeptor-Komplex getrennt und degradiert oder aber erneut an der Zelloberfläche freigesetzt.

Lenfernik et al. zeigten, dass die mitogenetische Antwort von EGFR auf Stimulation mit TGF- α durch die Co-Expression von HER2 potenziert wird. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass das EGFR/HER2-Heterodimer eine höhere Recycling-Rate hat, als das EGFR/EGFR-Homodimer (60).

EGFR steht in Verbindung mit heterologen Informationssystemen. Es gibt also die Möglichkeit der Tyrosinkinaseaktivierung ohne direkte Ligandenbindung an den EGFR. Diese Verknüpfungen sind essentiell, um die Vielzahl der von außen ankommenden Stimuli in eine limitierte Anzahl von intrazellulären Signaltransduktionswegen zu integrieren. EGFR und HER2 sind in die Signaltransduktion von G-Protein-abhängigen-Rezeptoren, Cytokin-Rezeptoren, Integrinen, Ionenkanälen und anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen involviert (60).

G-protein-coupled-receptors (GPCR) aktivieren indirekt Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen der Src-Familie, die den EGFR an anderer Stelle als der Autophosphorylierungsstelle phosphorylieren und damit aktivieren.

GPCR können auch über die Aktivierung von Metalloproteinasen, die membrangebundene Liganden des EGFR aus ihrer Bindung lösen und damit Einfluss auf die Aktivität der Tyrosinkinase des EGFR nehmen.

Der EGFR wird zusätzlich noch von Steroidhormonen beeinflusst, die die Transkription von Genen der Rezeptorliganden aktivieren. Östrogen kann zudem den EGFR durch das GPCR GPR 30 transaktivieren (3).

1.2 Klinische Relevanz

In vielen Karzinomen ist die Rezeptorfunktion des EGFR gestört. Es finden sich Überexpression, Verstärkung grundlegender Aktivierungen des EGFR durch mutierte Rezeptoren, Aktivierung autokriner „*growth-factor-loops*“ (z.B. mit Amphiregulin und TNF- α), Änderungen im Dimerisierungsprozess und Mangel an spezifischen Phosphatasen.

Gesteigerte Expression ohne Genamplifikation ist die häufigste bekannte Rezeptorfunktionsstörung in vielen Karzinomen (Mammakarzinome 14-91%, Blasenkarzinome 31-48%, Kolonkarzinome >80%, Glioblastome 40-50%, nichtkleinzellige Bronchialkarzinome 40-80%, Pankreaskarzinome 30-50%, Ovarialkarzinome 35-70% und Kopf- und Halstumore 80-100%) (67).

Überexpression ist häufig mit einer autokrinen Schleife eines oder mehrer Liganden vergesellschaftet. So ist z.B. in Kolonkarzinomzelllinien (HCA7 und Caco2) Amphiregulin ein potenter autokriner Faktor (16).

Für den bekanntesten Liganden des EGFR TGF- α wurde gezeigt, dass es in nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, Prostatakarzinomen und gastrointestinalen Tumoren zu einer Überexpression mit gleichzeitig gesteigerter Expression von EGFR kommt. Rubin et al. zeigte 1998, dass in seinem Patientenkollektiv die Höhe des Proteinlevels von EGFR and TGF- α bei primären Kopf- und Halstumoren mit dem rezidivfreien Überleben der Patienten korreliert war (65).

Die am besten untersuchte Mutation ist die EGFR-variant-III-Mutante (EGFRvIII). EGFRvIII zeigt eine Deletion der Aminosäuren 6–273. Diese Deletion führt zu einer Änderung in der extrazellulären Bindungsstelle des EGFR. Dadurch kommt es zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität (29). Diese EGFRvIII-Mutante wurde initial bei Glioblastomen entdeckt.

Man findet sie auch in Brustkarzinomen, nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen und Prostatakarzinomen, nicht aber in tumorfreien Geweben (32). Nagane et al. konnten zeigen, dass bei Glioblastomen die Expression der EGFRvIII-Mutante mit einer Resistenz gegen die gebräuchliche Cisplatintherapie verknüpft ist (60). Durch das ausschließliche Vorkommen der Mutante in Karzinomgewebe ist der EGFRvIII ein interessanter Ansatz in der Karzinomtherapie.

Eine hohe Expression von EGFR konnte als prognostischer Indikator bei Kopf- und Halstumoren, Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen, Zervixkarzinomen, Blasenkarzinomen und Ösophaguskarzinomen identifiziert werden. Etienne et al. zeigten 1999 in einer Studie mit 82 Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren des Kopf- und Halsbereiches, die mit Cisplatin und 5-Fluorouracil +/- Folsäure oder Radiotherapie behandelt wurden, dass eine hohe EGFR-Expressionsdichte einen größeren Einfluss auf die Prognose hat als die Mutation von p53 (24).

Eine Überexpression von EGFR und TGF- α konnte in 80-100% der Kopf- und Halstumoren im Vergleich zu normalen Expressionslevel bei gesunden Patienten nachgewiesen werden. Erhöhte EGFR-RNA-Level und EGFR-Proteine wurde auch in histologisch unauffälligen Geweben von Kopf- und Halstumorpatienten gefunden. Man kann daher davon ausgehen, dass die „*Upregulation*“ des EGFR ein frühes Ereignis in der Karzinogenese von Kopf- und Halstumoren ist (27).

In einer Studie mit nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen der beiden Rezeptoren der Erb-Familie, EGFR und HER2neu, die Prognose zusätzlich verschlechtert (8). Diese Studie macht einen EGFR-HER2neu „*Crosstalk*“ wahrscheinlich, der die EGFR-Signale und somit auch die Tumorprogression potenziert.

Die Bildung von Heterodimeren aus EGFR und HER2 führt zu einer erhöhten Bindungsaffinität von Liganden (EGF) und zu einer Stabilisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes. Ebenso wird beim Heterodimer EGFR/HER2 eine höhere „*Recycling*“-Rate des Komplexes beobachtet (3).

Es gibt verschiedene pharmakologische Strategien, um den Einfluss des EGFR auf Tumorerkrankungen zu reduzieren bzw. auszuschalten. Die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle ist Ziel von monoklonalen Antikörpern, die diese besetzen und somit die Bindung von Liganden und damit die Aktivierung des Rezeptors verhindern. Ligandentoxin-Konjugate bringen Toxine von z.B. Pseudomonaden

oder Diphtherie-Bakterien durch Endozytose des Toxin-Liganden-Rezeptorkomplexes direkt in EGFR-exprimierende Zellen (27). Auf der intrazellulären Seite des Rezeptors können Tyrosinkinaseinhibitoren die Tyrosinkinase an der ATP-Bindungsstelle blockieren und die Signaltransduktion verhindern. Ausgehend vom Zellkern kann mittels „*Antisense*“-Oligonukleotiden gegen EGFR-mRNA oder Liganden-mRNA die Proteinsynthese des Rezeptors oder der Liganden vermindert werden. Eine weitere Einflussmöglichkeit ist die Möglichkeit der Inhibition von Enzymen in der EGFR-Signalkaskade auf unterer Ebene.

Es gibt derzeit sechs spezifische monoklonale Antikörper gegen den EGFR: IMC-C225 (Cetuximab), ABX-EGF (Panitumumab), EMD 72000 (Matuzumab), MDX-447, HuMab-Maus, H-R3 (TheraCIM) und Mab 806.

Cetuximab bindet kompetitiv an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptor mit einer höheren Affinität als die natürlichen Liganden (49). Damit verhindert Cetuximab die Bindung rezeptoraktivierenden Liganden und induziert die Internalisation, den Abbau und die „*down*“-Regulation des Rezeptors. Die Inhibition der Zellproliferation, wie sie *in vitro* beobachtet wurde, war mit einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase und/oder einer gesteigerten Apoptose der mit Cetuximab behandelten Zellen assoziiert. Diese wird mit einer Blockade des Zellzyklus durch erhöhten Level von p27 mit Inhibition der Cyclin-Dependent-Kinase-2 (CDK2) und erhöhten Niveau und Aktivität von pro-apoptotischen Molekülen hervorgerufen. Cetuximab zeigt *in vivo* eine stärkere Wachstumshemmung von Tumoren als *in vitro*. Die Therapie mit Cetuximab aktiviert zusätzliche antitumorale Mechanismen. Die Inhibition der Angiogenese durch Cetuximab ließ sich in einigen präklinischen Studien durch eine gesteigerte Apoptose von Gefäßendothelzellen bei mit Cetuximab behandelten heterotransplantierten Mäusen mit humanen Tumorxenografts zeigen. Cetuximab inhibiert die Produktion von *Vascular-Endothelial-Growth-Factor* (VEGF) in Epidermoidkarzinomen, was zu einer Verminderung der Blutgefäßbildung führt und in einer Wachstumseinschränkung des Tumors resultiert. In Blasenkarzinom-xenografts bei Mäusen konnte eine Reduktion der Tumorzellmigration gezeigt werden. Bei Mäusen mit Xenografts von 253J B-V Tumoren oder Prostata Tumoren senkte Cetuximab signifikant die Metastasierungsrate (32; 34).

Präklinische Studien haben potente Antitumorwirkung bei squamösen Karzinomzelllinien aus dem Kopf- und Halsbereich in vitro und in humanen Tumorgrafts in vivo gezeigt. In einer kürzlich veröffentlichten internationalen randomisierte Phase-III-Studie mit 424 Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren im Kopf- und Halsbereich, die mit Radio versus Radio und Cetuximab behandelt wurden, zeigten sich klare Vorteile für den mit Cetuximab behandelten Arm in der lokalen Rezidivkontrolle (8% nach 2 Jahren) und dem Überleben der Patientinnen und Patienten (13% nach 3 Jahren) und führte zur klinischen Zulassung von Cetuximab (34; 37).

Die am häufigsten gezeigte Nebenwirkung ist ein akneartiger Ausschlag, 70-80% der Patientinnen und Patienten sind betroffen. Meist ist diese aber mild, nur selten dosislimitierend und mit zunehmender Therapiezeit eher rückläufig. Eine Untersuchung des Ausschlags an Hautbiopsien hat gezeigt, dass der EGFR in diesen Hautarealen weit verbreitet ist. Es zeigte sich eine neutrophile Follikulitis. In einigen Phase-II-Studien an Patienten mit Kolonkarzinomen, Kopf- und Halstumoren und Pankreaskarzinomen zeigte sich eine signifikante Korrelation des akneartigen Ausschlags mit dem Ansprechen auf die Therapie sodass der akneartige Ausschlag ein prognostischer Marker für die Cetuximabtherapie darstellt (9; 35). Ernsthafte toxische Reaktionen auf Cetuximab (chimärer Antikörper) sind Hypersensitivität, Infusionsreaktionen und interstitielle Lungenerkrankungen. Phase-II-Studien haben Ansprechraten von Cetuximab und Irinotecan auf irinotecanresistente Kolonkarzinomzellen in 22,9% der Erkrankten gezeigt. In diesem Fall zeigte sich keine Korrelation zwischen der tumoralen EGFR-Expression und dem Ansprechen auf die Cetuximabtherapie (10). Cetuximab ist von der US Food and Drug Administration und von der Swiss Medicine Control Agency und in weiteren 27 EU-Ländern für diese Indikation zugelassen worden (Feb 2004) (34; 76). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Phase-II-Studie mit Patientinnen und Patienten mit cisplatinresistenten Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches erzielt. Auch hier konnte durch Erweiterung der Cisplatintherapie mit Cetuximab ein signifikant höheres Ansprechen der Tumoren festgestellt werden (10).

Panitumumab (ABX-EGF) ist ein humaner monoklonaler EGFR-Antikörper. In vitro blockt er die Bindung von EGF und TGF- α an den EGFR und damit die Autophosphorylierung der Tyrosinkinase. Wie auch Cetuximab führt die

Panitumumab-Therapie zur Internalisation des EGFR. In vivo und in vitro zeigte Panitumumab Effektivität gegenüber Prostatakarzinomen und Nierenzellkarzinomen. Bei Prostatakarzinomen ließen sich auch antiangiogene Effekte zeigen.

Die anderen genannten Antikörper zeigen ebenfalls viel versprechende Ergebnisse in frühen klinischen Phase I/II-Studien. Auch Antikörper, die sich spezifisch gegen die EGFRvIII Mutante des EGFR richten, sind entwickelt worden.

Die intrazellulär wirkenden Tyrosinkinaseinhibitoren sind synthetische Quinazolinderivate mit niedrigem molekularem Gewicht. Sie interagieren mit der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne verschiedener Rezeptoren, wie auch die des EGFR. Zurzeit gibt es sechs Tyrosinkinaseinhibitoren, die den EGFR blockieren und klinisch im Rahmen von Studien oder zugelassen als Therapeutikum verwendet werden. Spezifisch für den EGFR sind Gefitinib (ZD 1839, Iressa) und Erlotinib (Tarceva HC1, OSI-I774,). Canertinib (CI-1033) blockt Rezeptoren aus der ErbB-Familie und ist aus dieser Gruppe mit EKB-569 die einzige Substanz die irreversibel an die Tyrosinkinasedomäne bindet. EKB-569, GW2016 und PKI-166 sind spezifisch für EGFR und HER2.

Erlotinib (Tarceva) zeigte in vitro und in vivo Antitumoraktivität gegen humane Karzinomzellen (Kolonkarzinome, Kopf- und Halstumoren, nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, Pankreaskarzinome). Iwata et al. konnten zeigen, dass Erlotinib auch die EGFRvIII Mutante hemmt. In präklinischen Studien zeigte Erlotinib in Kombination mit Cisplatin, Doxorubicin, Gemcitabine und Paclitaxel das Potential, die Effektivität der Substanzen zu erhöhen und die Entwicklung von Resistenzen zu vermindern (1).

Die Monotherapie mit Erlotinib in einer Phase-III-Studie zur Zweit- und Drittlinientherapie von Patienten mit metastasierten nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen zeigte ein verlängertes Überleben der Patienten im Erlotinib-Arm.

In den zwei Phase-III-Studien „TRIBUTE“ (Herbst et al. 2004) und „TALENT“ (Gatzemeier et al. 2004) wurde Erlotinib oder Placebo zu der üblichen Chemotherapie bei erstmaliger Therapie von Patienten mit nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen zugefügt. Es zeigte sich in beiden Studien kein Vorteil im medianen oder progressfreien Überleben der Patienten des Erlotinib-Armes (34).

1.3 Gefitinib

Gefitinib ist ein spezifischer, reversibler Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase. Es handelt sich chemisch gesehen um das (4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-7-methoxy-6-(3-morpholinopropoxy)quinazolin.

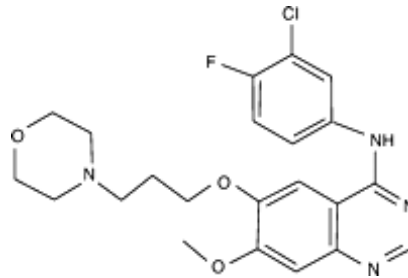


Abbildung 4: Strukturformel Gefitinib

Gefitinib inhibiert die Tyrosinkinase von isoliertem EGFR mit einer IC_{50} von 0,023-0,079 μ M. Um die HER2 Rezeptortyrosinkinase zu inhibieren wird die 100-mal höhere Konzentration benötigt. Gefitinib konkurriert kompetitiv mit ATP um die Bindungsstelle an der Tyrosinkinase. Sowohl in vivo als auch in vitro hemmt Gefitinib das Wachstum einer Vielzahl von EGFR-exprimierenden Tumorzelllinien, wie die von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, Kopf- und Halstumorzellen, Blasen-tumorzellen, Prostata-tumorzellen, Mammakarzinomzellen, Ovarialkarzinomzellen und Kolonkarzinomzellen. Dabei ist die Aktivität der Substanz in erster Linie zytostatisch (63). Es wurde ein Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 Phase beobachtet mit einem dosisabhängigen Anstieg des cyclinabhängigen $p27^{KIP1}$ -Kinaseinhibitors. Barnes et al. konnten in einer Studie an HaCaT-Zellen und Hautkarzinomzellen den Effekt von Gefitinib auf die Stimulation der p42/44-Mitogen-Activated-Proteinkinase (MAPK) und p21-Activated-Kinase 1 (Pak1) zeigen, welche für die Transformation, Beweglichkeit und das Zellüberleben wichtig sind. Gefitinib inhibiert EGFR, die MAPK- Phosphorylierung und die Pak1-Aktivität in exponentiell wachsenden Tumorzellen. Außerdem verringert es dosisabhängig die EGF-induzierte Stimulation des EGFR zur Autophosphorylierung. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Gefitinib das EGF-induzierte *Cytoskeleton-remodeling*, das Zellwachstum und in vitro die Invasivität von Tumorzellen hemmt; die Differenzierung der Zellen wird gefördert (5).

Ferner kann Gefitinib die Synthese von angiogenen Faktoren wie VEGF, IL-8 und bFGF und damit die Migration und die Formation von mikrovaskulären Endothelzellen hemmen (52).

In vivo-Studien haben gezeigt, dass Gefitinib Antitumoreffekte gegen heterotransplantierte humane Xenografts von Ovarialkarzinomen, hormonresistenten Prostatakarzinomen, duktalem Mammakarzinomen, Kolon-, Vulva-, kleinzelligen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen induziert. Es konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der EGFR-Expression und der Sensitivität der Tumoren gegenüber Gefitinib gefunden werden. Vielmehr muss die Sensitivität gegenüber Gefitinib von anderen Faktoren abhängig sein, wie die Konzentration der rezeptoraktivierenden Liganden, ligandenunabhängige Mutanten, andere Aktivierungsschemata der Signaltransduktionskaskade oder die Dimerisierungspartner aus der EGFR-Familie (32).

Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass einige Tumoren, die HER2 oder HER3, nicht aber EGFR überexprimieren, ebenfalls sensitiv gegenüber Gefitinib sind. In diesem Fall hat Gefitinib keine direkte Wirkung auf HER2- bzw. HER3-Rezeptoren, sondern wirkt über die Blockierung des EGFR in den HER2/EGFR- oder HER3/EGFR-Heterodimeren. Dabei ist zu erwähnen, dass Gefitinib keinen Einfluss auf die Aktivität von HER2/HER2-Homodimeren hat, da diese ligandenunabhängig aktiviert werden (46; 52).

Präklinische Studien haben gezeigt, dass die Kombination von Gefitinib mit Chemotherapeutikern wie Platinderivate, Oxaliplatin aber auch Docetaxel, Etoposid, Doxorubicin, Topotecan, und Raltitrexed eine synergistische zytostatische Wirkung auf Tumoren mit EGF-Rezeptorexpression (Lunge-, Kolon-, Mama-, Ovarialtumor) hat (6).

In einer Phase-I-Studie zum nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom wurde die tägliche orale Gabe von bis zu 700mg Gefitinib als Monotherapie gut toleriert. In dieser Studie waren insgesamt 252 Patienten eingeschlossen, die bereits ausgiebig vortherapiert waren. Die häufigsten therapieassoziierten Nebenwirkungen von Gefitinib waren Diarrhöe, reversibler akneartiger Hautausschlag, Nausea, Erbrechen und Asthenie. Die meisten Nebenwirkungen in dieser Studie waren mit NCI-CCTC Grad 1 und 2 mild und vorübergehend (National Cancer Institute Canadian Common Toxicity Criteria). Die Inzidenz und der Schweregrad der Nebenwirkungen stiegen mit der Erhöhung der Dosierung. Eine

Antitumorwirkung von Gefitinib konnte zwischen 150 und 700mg beobachtet werden, ohne eine Dosisabhängigkeit zu zeigen (37).

Im Bereich der Kopf- und Halstumoren wurde Gefitinib in Phase II Studien von Cohen et al. getestet. Die Studie schloss 52 Patienten mit rezidierten oder metastasierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches ein und verwendete eine Dosis von 500mg Gefitinib (ZD1839) pro Tag als Monotherapie. Es stellte sich heraus, dass Gefitinib als Monotherapie wirksam (10,3% Response-Rate und 53% Erhaltung des Stadiums) und gut verträglich ist. In dieser Studie war die akneforme Hautreaktion ein Parameter für das Ansprechen der Patienten auf die Therapie (15).

Die zwei großen Phase-II-Studien (IDEAL1 und IDEAL2) schlossen 425 Patienten mit fortgeschrittenen nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (Stadium III und IV) ein, die bisher eine oder mehrere Chemotherapien erhalten hatten. Die Patienten wurden mit 250mg oder 500mg Gefitinib als Monotherapie therapiert. Gefitinib zeigte in beiden Dosierungen eine Antitumoraktivität (Tumorverkleinerung oder Krankheitsstabilisierung) in mehr als 40% der Patienten. Das mittlere Überleben war mit zwischen 6 und 8 Monaten ebenso hoch wie das Überleben vergleichbarer Patientengruppen, die mit Docetaxel, dem zuvor einzigen zugelassenen „secondline“-Therapeutikum nichtkleinzelliger Bronchialtumoren, therapiert wurden. Es zeigte sich auch in diesen Studien eine rasche Verbesserung der krankheitsassoziierten Symptome innerhalb von 8-10 Tagen. Zwischen den beiden Dosierungen konnte kein Vorteil einer Dosierung bezüglich der Ansprechrate der Tumoren oder dem Überleben gefunden werden. Allerdings zeigte die höhere Dosierung deutlich mehr Nebenwirkungen. Diese waren vor allem Diarrhöe und akneartiger Ausschlag. In diesen Studien trat, anders als in anderen, kein Zusammenhang zwischen dem akneartigem Ausschlag und der Effektivität der Gefitinibtherapie auf. Es wurde gezeigt, dass in den IDEAL-Studien Tumoren von Frauen mit Adenokarzinomen, die nie geraucht hatten, besser auf Gefitinib ansprachen als die übrigen Patienten (29).

Aufgrund dieser Studien wurde Gefitinib in 18 Ländern inklusive der USA, Kanada, Japan und Australien als Monotherapie für die Therapie von refraktären nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen zeitweise zugelassen (34).

Die beiden großen randomisierten Phase-III-Studien INTAKT I und INTAKT II schlossen 2030 Patienten mit nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen als

Erstlinientherapie ein. Verglichen wurden die Chemotherapieregime Cisplatin/Gemcitabine +/- Gefitinib und Carboplatin/Paclitaxel +/- Gefitinib. Es zeigte sich kein Vorteil im medianen Überleben, Zeit bis zur Tumorprogression oder Ansprechrate der Tumoren für die Gefitinib-Arme der Studien (29).

1.4 Zytostatika: Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Paclitaxel und Irinotecan

1.4.1 Cisplatin

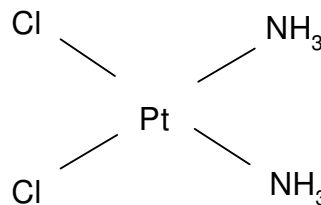


Abbildung 5: Strukturformel Cisplatin

Cisplatin (Cis-diaminedichloroplatinum) ist ein in der Therapie von verschiedenen Tumoren etabliertes Zytostatikum. Es wird bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs, nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, Hodentumoren, Ovarialkarzinomen, Zervixkarzinomen, Endometriumkarzinomen, Blasenkarzinomen, Sarkomen, Plattenepithelkarzinomen und Magenkarzinomen angewandt.

Cisplatin verursacht die Bildung von Cisplatinaddukten mit DNA und Proteinen. Die beiden Chloro-Liganden reagieren am Imidazolring des Guanins (G) oder Adenosins (A) an der Position N7 und führen zu Inter- oder Intrastrangcrosslink-Verknüpfungen zwischen GG und AA oder untereinander. Damit wird die Replikation und/oder die Transkription inhibiert (54).

Es kommt weiterhin zur Induktion von Punktmutationen. Cisplatin hemmt die DNA-Reparatur und die Telomeraseaktivität. Es hemmt die Alkylierung von RNA und Plasmaproteinen. Cisplatin kann intravenös oder intraperitoneal verabreicht werden. Die Nebenwirkungen beinhalten Nephro- und Ototoxizität, neurotoxische Störungen, gastrointestinale Störungen, Enteritis, Herzerkrankungen und Störungen der Hämatopoese (69).

1.4.2 Carboplatin

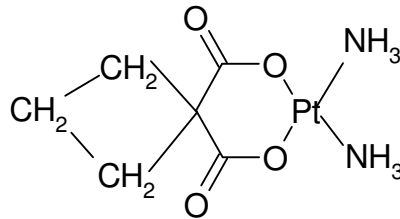


Abbildung 6: Strukturformel Carboplatin (Cyclobutancarbonsäurecisdiaminplatin)

Carboplatin bildet ebenfalls DNA-Addukte. Es führt über DNA-Quervernetzungen zu Strangbrüchen. Cisplatin und Carboplatin haben nahezu denselben Wirkungsbereich. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Cisplatin und Carboplatin sind die spezifischen Nebenwirkungen. Nephrotoxizität war lange der dosislimitierende Faktor in der platinbasierten Therapie. Mit Carboplatin behandelte Patienten haben selten und nur bei extrem hohen Dosen bleibende Nierenschäden. Allerdings verursacht Carboplatin im Vergleich mit Cisplatin eine höhere Myelosuppression (Leukozytopenien in 18% und Thrombozytopenien in 25%). In mehr als 6% der Carboplatinbehandlungen kommt es zu leukopeniebedingten Infektionen oder thrombozytopenieinduzierten Blutungen. Cisplatin führt nur in 5-6% zu ernsthaften Leuko- und Thrombozytopenien (31).

5-Fluorouracil

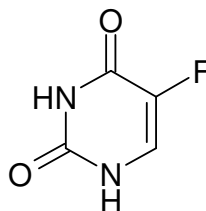


Abbildung 7: Strukturformel 5-Fluorouracil

5-Fluorouracil gehört zur Gruppe der Antimetabolite. Es hemmt die Thymidilatsynthetase. Dies führt zur Depletion von Thymidin-Triphosphat an

dessen Stelle 5-Fluorouracil als „falsche Base“ in RNA und DNA eingebaut wird. Der Einbau führt folglich zur Apoptoseeinleitung. 5-Fluorouracil ist ein fester Bestandteil vieler Standardtherapieschemata gynäkologischer-, urologischer- und gastrointestinaler Karzinomen. Als Nebenwirkungen der 5-Fluorouraciltherapie sind unter anderem Schleimhauttoxizität und Myelosuppression anzuführen.

1.4.3 Paclitaxel

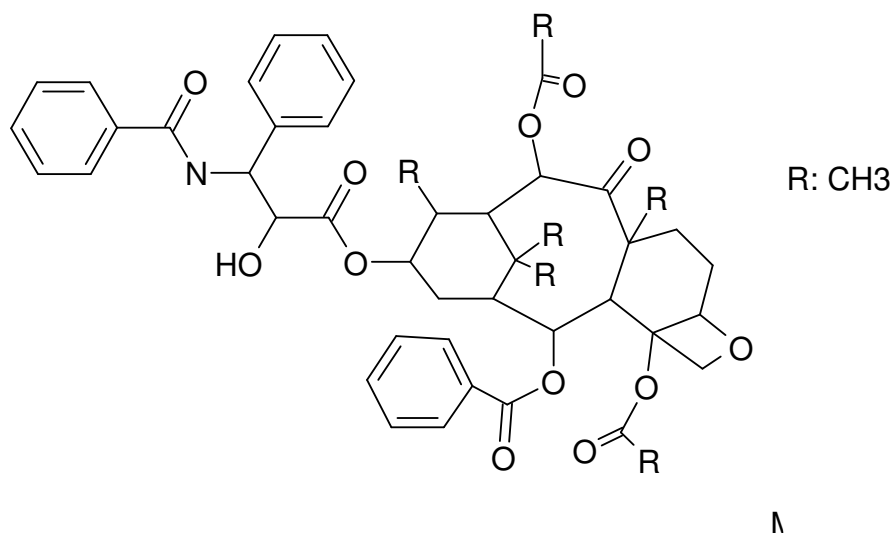


Abbildung 8: Strukturformel Paclitaxel

Paclitaxel gehört zur Gruppe der Taxane. Sein Wirkstoff wird aus der Rinde der nordamerikanischen Eibe (*Taxus brevifolia*) gewonnen. Unter Verwendung der Ausgangssubstanz 10-Deacetylbaccatin wird das halbsynthetische Chemotherapeutikum hergestellt. Die pharmakologische Wirkung ergibt sich aus der antitubulinen Wirkung der Substanz. Sie stört die strukturelle Reorganisation der intrazellulären Mikrotubuli durch Inhibition der Depolymerisation und Förderung der Aggregation freier Tubulineinheiten. Es kommt zur Akkumulation sehr stabiler funktionsgestörter Tubuli. Die Zellen akkumulieren in der G2/M Phase und können nicht mehr in die G1-Phase übertreten. Damit ist eine geordnete Zellteilung nicht mehr möglich. Paclitaxel wird in der Therapie von gynäkologischen Tumoren oder als Radiosensitizer eingesetzt (45). Dosislimitierende unerwünschte Wirkungen von Paclitaxel sind vor allem Knochenmarkssuppression und die Neurotoxizität.

1.4.4 Irinotecan (CPT-11)

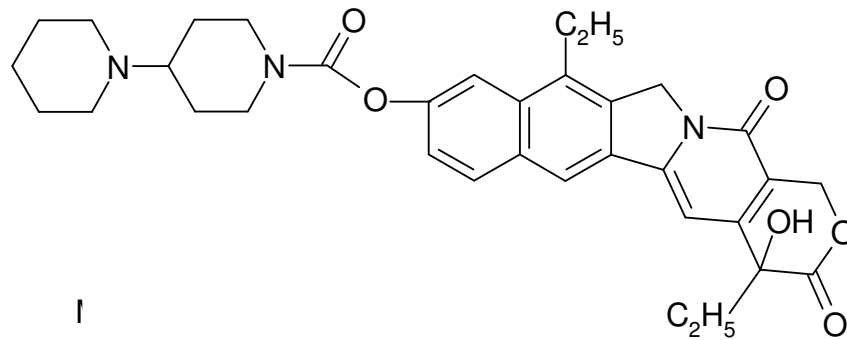


Abbildung 9: Strukturformel Irinotecan CPT-11

Irinotecan ist ein semisynthetisch hergestelltes Camptothecin (CPT)-Derivat. Camptothecin wurde ursprünglich aus der Pflanze *Camptotheca acuminata* extrahiert. Als *Prodrug* wird es durch die zelluläre Carboxylesterase zu dem zytotoxisch wirksamen SN38 (7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin) metabolisiert.

SN38 ist ein Topoisomerase-I-Hemmstoff (Topo-I). Bei der Transkription der DNA entstehen DNA-Überspiralisierungen, die um weiterhin DNA-Replikation, -Transkription, -Rekombination und -Reparatur zu ermöglichen, reorganisiert werden müssen. Topo I relaxiert die aufgewundene überspiralisierte DNA durch Schneiden und Relegieren der Doppelstrang-DNA. Dabei wird die Topo I kovalent an die Tyrosinhydroxylgruppe am 5'-Ende mit dem 3'-Phosphatrest gebunden. Der intakte DNA-Strang kann durch die Schnittstelle hindurchtreten und im letzten enzymatischen Schritt werden die DNA-Enden wieder religiert (77).

Die Proteintranskription von Topo I wird durch zahlreiche positive und negative Faktoren wie z.B. NF- κ , NF-IL-6, und Faktor Sp1 beeinflusst. Die Kasein-II und Proteinkinase C abhängige Tyrosinkinase beeinflusst den Phosphorylierungszustand der Topo-I, der wesentlich für die posttranskriptive Regulation ist.

SN38 bewirkt, dass die kovalente Bindung zwischen Topo-I und DNA stabilisiert wird („cleavable complex“). In der S-Phase führt dieser Komplex beim Fortschreiten der Replikationsgabel zu DNA-Doppelstrangbrüchen (20; 28).

Resistenzen gegen Irinotecan entstehen durch Verminderung der Topo-I-Expression, erhöhter Expression von Topoisomerase-II, verminderter Carboxylesteraseaktivität oder erhöhter UDP-Glucoronyltransferase-Aktivität. Indikation für die Therapie mit Irinotecan als Monotherapie oder in Kombination mit

5-Fluorouracil oder Cetuximab ist das kolorektale Karzinom. In Kombination mit 5-Fluorouracil wird es auch für die Therapie von Magenkarzinomen eingesetzt. Dosislimitierend ist bei dieser Substanz die Hämatotoxizität und die gastrointestinalen Nebenwirkungen wie Diarrhöe.

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In einer experimentellen Studie an humanen Plattenepithelkarzinomzellen aus dem Kopf- und Halstumorbereich (A253) wird der in vitro Einfluss der EGFR-Blockade durch den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib auf die Zytotoxizität von Platinderivaten (Carboplatin, Cisplatin), Fluoropyrimidinen (5-Fluorouracil), Irinotecan und Paclitaxel evaluiert. Weiterhin soll der Einfluss von Gefitinib und die Stimulation mit *Epidermal growth factor* (EGF) auf die EGFR-Expression auf mRNA-Ebene mittels Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) und auf Proteinebene mittels Westernblot in A253 Karzinomzellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinie A253

Die Zelllinie A253 ist eine Plattenepithelkarzinomzelllinie aus dem Bereich der Kopf- und Halstumoren. Sie wurde 1973 aus einem Epidermoid Karzinom eines 54 jährigen Mannes etabliert (The global Bioresource Center (ATCC), USA, Bestellnummer HTB-41) (30).

2.2 Kulturtechnik

Die Zelllinie A253 wächst als Monolayer und wurde in der exponentiellen Wachstumsphase für die Versuche kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einem Heraeus Inkubator mit einem Kohlendioxidgehalt von 5%, einer Temperatur von 37° Celsius und einer Luftfeuchtigkeit von 95% in RPMI-Medium. Für die Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Vor der Kultivierung wurden sie zweimal gewaschen und in RPMI-Medium übertragen.

Um ein optimales Wachstum zu ermöglichen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-80% passagiert. Dabei wurden nach Abgießen des alten Mediums die am Plastikboden der Zellkulturflasche heftenden Zellen zunächst mit 3-8ml *Phosphate buffered Saline* (PBS) gewaschen, um eine Hemmung des Trypsins durch das im Medium enthaltene fetale Kälberserum (FCS) zu vermeiden. Dann wurden sie durch Aufgeben von 2-3ml Trypsin passagiert, in Nährmedium resuspendiert und in geeigneter Verdünnung in die Zellkulturflasche eingesät. In der Wachstumskinetik zeigte sich ein exponentielles Wachstum bei der Eingabe von ca. 10^5 Zellen in einer T25-Zellflasche.

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einem Heraeus Lamin Air System mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Die Reagenzien wurden in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 37° Celsius gebracht.

2.3 Wachstumskinetik

Die optimale Eingabezellzahl der Zellen für die Zytotoxizitätstests ist diejenige, mit der ein nahezu exponentielles Wachstum der Zellen über den gesamten Versuchszeitraum möglich ist. Um dies zu ermitteln, wurde eine Wachstumskinetik durchgeführt.

Die Zellen wurden, wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, vorbereitet, mit Trypsin abgelöst und gezählt. Die Zellsuspension wurde auf die verschiedenen Zellzahlen verdünnt (300, 500, 1000, 1500, 2000 Zellen pro 100µl) und auf sieben Mikrotiterplatten mit jeweils jeder Zellzahl auf einer Spalte aufgetragen. In jedes Well wurde 100µl RPMI-Medium und anschließend 100µl der Zellsuspension pipettiert. Nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168h wurde je eine der Platten aus dem Inkubator entnommen, das Medium entfernt und mit Hilfe von 50µl 10%iger Trichloressigsäure (TCA) (40g TCA auf 400ml aqua dest.) fixiert. Mit Hilfe der SRB-Technik (Sulforhodamin B, ausführliche Beschreibung siehe Abschnitt SRB-Test) ergab sich eine optimale Zellzahl von 600 Zellen pro Well. Bei dieser Zellzahl ist ein exponentielles Wachstum in den ersten 120 h gewährleistet.

2.4 Technik des SRB Tests

2.4.1 Sulforhodamin B

Sulforhodamin **B** (SRB) ist ein anionisches, pinkfarbenes Aminoxanthen mit zwei Sulfatgruppen und einem Molekulargewicht von 580,66g/mol.

Bei dem SRB-Test (70) wird mit Hilfe einer Proteinfärbung durch elektrostatische Bindung des SRB-Komplexes an basische Aminosäuren ein Rückschluss auf die Anzahl der Zellen pro Einheit möglich. Durch diesen Test werden Proliferationsunterschiede verschiedener Zellen quantifizierbar.

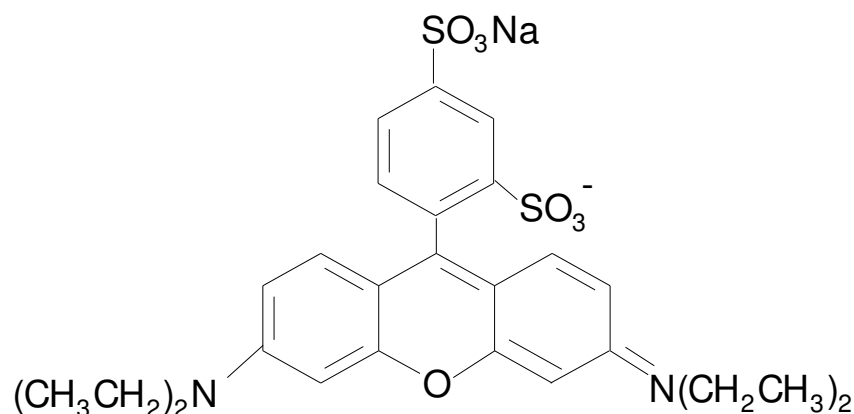


Abbildung 10: Strukturformel Sulforhodamin B ($C_{27}H_{29}N_2NaO_7S_2$)

2.4.2 Verlauf des Tests

Zunächst wurden Zellen in der Proliferationsphase abgelöst, gezählt und auf eine Suspension mit 600 Zellen pro 100µl eingestellt. 100µl dieser Zellsuspension wurde auf die MTT-Platte gegeben und 24h inkubiert. Im nächsten Versuchsschritt wurden die Zytostatika in aufsteigender Konzentration aufgegeben. Die verwendeten Zytostatika waren Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Paclitaxel. Cisplatin gelöst in Wasser für Injektionszwecke wurde in einer Verdünnungsreihe von 3,3nM-100µM verwendet. Carboplatin (gelöst in 0,9% NaCl) wurde in Konzentrationen von 0,033-333µM aufgegeben. 5-Fluorouracil (Injektionslösung (50mg/ml) und Natriumhydroxid) wurde in Verdünnungsschritten von 1-333µM verwendet. Irinotecan wurde in Konzentrationen von 0,1nM-0,33µM und Paclitaxel in Konzentrationen von 0,33nM-1µM verwendet. Gefitinib wurde in Konzentrationen von 0,1-333µM mit den Inkubationszeiten 24h und 120h benutzt.

Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurde das jeweilige Zytostatikum steril, mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, von den Platten abgesaugt und 200µl RPMI-Medium aufgegeben. Die sich anschließende Inkubationszeit betrug 72h. Nach 120h wurde das Medium entfernt und die Zellen 1-2h mit 50µl 10%iger, 4°C kalter Trichloressigsäure (TCA) inkubiert und fixiert. Die Zellproteine wurden mit 50µl/Well 0,4%iger Sulforhodamin B-Lösung (4g SRB auf 1L 1%ige Essigsäure, pH 3) durch eine elektrostatische Bindung gefärbt. Das restliche, ungebundene SRB wurde mit 1%iger Essigsäure mit einem automatischen Plattenspüler (*Platewriter*) entfernt. Durch Zugabe von 150µl Hydroxymethylaminomethan (TRIS) in einer Konzentration von 10mM und einem pH von 10,5 wurde der Farbstoff in Lösung gebracht und die Konzentration mit Hilfe eines Photometers bei 570nm bestimmt. Die Lichtabsorption korreliert mit dem Proteingehalt und dieser mit der Zellzahl pro Well. Die Zytostatikakonzentration, bei der 50% der Zellen gegenüber einer unbehandelten Kontrolle im Wachstum gehemmt werden, wird IC₅₀ genannt.

2.5 Interaktionsanalysen: (Interaktion zwischen Gefitinib und anderen Zytostatika)

In den durchgeführten Versuchen wurde die Interaktion zwischen ZD1839 (Gefitinib) (Astra Zeneca, Alderley Park, Macclesfield, United Kingdom) in nichttoxischen Konzentrationen mit Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Paclitaxel

untersucht. Jeder Versuch bestand aus einem Doppelansatz mit und ohne $\frac{1}{8}$ oder $\frac{1}{4}$ der IC_{50} Gefitinib.

2.5.1 Versuch mit $\frac{1}{8} IC_{50}$ Gefitinib

Nach 24h Inkubation der A253-Zellen wurde Gefitinib in einer Konzentration von $\frac{1}{8} IC_{50}$ auf die Mikrotiterplatten aufgegeben. Dies entspricht einer Endkonzentration von $0,75\mu M$ Gefitinib.

Eine Kontrollreihe wurde ausschließlich mit Gefitinib behandelt, um die Verwendung des Zytostatikums in nicht zytotoxischer Konzentration sicherzustellen. In die restlichen Vertiefungen wurde für eine zweistündige Inkubation Gefitinib gegeben. Im Anschluss wurde die Verdünnungsreihe des jeweiligen Zytostatikums aufgegeben. Nach weiteren 22h Inkubation wurde die gesamte Lösung, eine Mischung aus Medium, Gefitinib und Zytostatika steril abgesaugt und $200\mu l$ frisches RPMI-Medium aufgegeben. 48h später wurden die Platten fixiert und ausgewertet.

Sequenz über 120 Stunden:

- 24h Inkubation mit Medium
- 2h Gefitinib $\frac{1}{8} IC_{50}$ + 22h Zytostatikum
- 48h Inkubation mit Medium.

2.5.2 Versuch mit $\frac{1}{4} IC_{50}$ Gefitinib

Der zweite Ansatz wurde analog zu dem ersten durchgeführt, allerdings mit einer Endkonzentration vom $\frac{1}{4} IC_{50}$ Gefitinib ($1,5\mu M$).

2.5.3 Kontrollansatz mit RPMI-Medium

Auf diese Platte wurde die IC_{50} des Zytostatikums kontrolliert. Statt der Gefitinibverdünnung wurde RPMI-Medium in die Vertiefungen pipettiert.

Sequenz über 120h:

- 24h Inkubation mit Medium
- 2h Medium +22h Zytostatikum
- 48h Inkubation mit Medium.

2.6 Das Testprinzip des Westernblots

Der Westernblot ermöglicht die Auftrennung von Zellproteinen nach Molekulargewicht. Die Proteinbanden können dann mit spezifischen Antikörpern identifiziert und semiquantitativ ausgewertet werden.

2.6.1 Proteinisolierung

Die Zellen wurden zunächst, wie schon beschrieben abgelöst. Die in RPMI-Medium gelösten Zellen wurden 5min bei 1000g zentrifugiert und anschließend zweimal mit 4°C kaltem PBS resuspendiert und zentrifugiert. Aus den gewaschenen Zellen wurden die Proteine isoliert. Dazu mussten die Zellen zunächst homogenisiert werden. Jedes Zellpellet wurde mit 985µl RIPA-Puffer [100ml Stammlösung: 605,5mg Tris (pH 7,4), 876,6mg NaCl, 1ml 100mM EDTA Stocklösung, 1ml Triton x-100 bzw. NP-40, 40 ml 10%ige Natriumdeoxycholat, 1ml 10%ige SDS Lösung, Aqua dest.] und je 5µl frisch hinzugefügten Proteaseinhibitoren (Aprotinin 5µg/ml, Leupeptin und PMSF) aufgenommen, resuspendiert und 20-30min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Suspensate zwei- bis dreimal mechanisch aufgebrochen.

Anschließend wurde die Zellsuspension in 10sec. Abständen 2-3 mal für 5sec mit einem Ultraschallhomogenisator (Sonifer B12, Branson Sonic Pover company) homogenisiert. Durch den RIPA-Puffer und den Ultraschallhomogenisator wurden die Zellen komplett lysiert und die Proteine für die Isolation zugänglich.

Für die Proteinisolation wurde das Zellhomogenisat in ein vorgekühltes Eppendorfcup überführt und bei 14.000g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die im klaren Überstand befindlichen Proteine wurden in ein neues Cup überführt und die Proteinkonzentration bestimmt.

Für die Konzentrationsbestimmung wurde der BIO-RAD-Protein Essay nach der Methode von Bradford benutzt (64). Dazu wurden die Proteine (30µl der Lösung) mittels des Bradford-Silbernitrat-Reagenzes (1,2ml) angefärbt und deren Konzentration bei 570nm in einem Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (Dynex-Photometer) bestimmt. Für die weitere Bearbeitung wurden die Proteinlösungen fraktioniert und bei -80°C eingefroren.

2.6.2 Auftrennen der Proteinlösungen mittels SDS-Gelelektrophorese

Pro Versuch wurden jeweils zwei Trenngele gegossen. Ein 5%iges Gel (Trenngel: 22,7ml bidest. Wasser, 10ml Trennpuffer, 0,4ml 10% SDS, 6,6ml 30% Acrylamid, 0,2ml 10%iges APS und 0,05 ml Temed) zur Detektion des EGF-Rezeptors und ein 12,5%iges Gel (Trenngel 12,8ml bidest. Wasser, 10ml Trennpuffer (0,5M Tris-HCl; pH 6,8), 0,4ml 10% SDS, 16,6ml Acrylamid, 0,2ml 10%iges APS und 0,05 ml Temed zum Starten des Polymerisationsvorgangs) zur Trennung der β -Actine. Beide Gele bestanden aus einem Sammelgel (6,1ml bidest. Wasser, 2,5ml Sammelpuffer (1,5M Tris-HCl; pH 8,8), 0,1ml SDS 10%, 1,3ml Acrylamid 30%, 0,1ml APS 10% und 0,025ml Temed (100%)) und dem jeweiligen Trenngel.

In jedem Ansatz lief in der ersten Spalte des Gels ein genormter Molekulargewichtsmarker [der Full Range Rainbow Marker - RPN 800 - mit einem Molekulargewichtsbereich zwischen 10-25 kDa] mit, um die spezifischen Banden jeweils einem speziellen Molekulargewicht zuordnen zu können.

2.6.3 Herstellen der Probe, Proteintrennung und -transfer

Die Proben wurden auf 50 μ g Proteinextrakt eingestellt, mit bidest. Wasser auf 20 μ l aufgefüllt, 20 μ l Ladepuffer (0,625 ml 0,0625 M Tris-HCl (pH: 6,8), 0,75ml 3%ige SDS-Lösung, 100mg DTT, 1,149ml 20%iges Glycerol und 0,1ml 0,01%iges Bromphenolblau) zugegeben und 3min bei 100°C inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurde die Probe mittels Hamelton-Spritze auf das Gel aufgetragen, bei 20mA gesammelt und bei 40mA getrennt.

Die im Gel aufgetrennten Proteinbanden konnten mittels Transferpuffer (320ml Tris-Glycerin-SDS-Puffer, 640ml Methanol, 2240ml destilliertes Wasser) in der Transferkammer der Firma BIORAD bei 40V, 4°C für 12h auf eine Nitrozellulosemembran (amersham pharma biotech) übertragen und mit Fastgreen (FastGreen FCF, Sigma) gefärbt werden, um den Proteintransfer zu kontrollieren.

2.6.4 Immunodetektion

Die Immunodetektion der einzelnen Proteinbanden war für jedes Protein spezifisch. Allen gemeinsam ist bei diesem technischen Verfahren, dass jeweils zwei Antikörper benötigt werden, um die Proteinbande sichtbar zu machen. Der erste Antikörper ist spezifisch für das entsprechende Protein (EGFR, β -Actine), der zweite Antikörper ist spezifisch für den ersten Antikörper und ist mit einer Peroxidase gekoppelt. Damit

korreliert die im Antigenantikörperkomplex gebundene Peroxidaseaktivität quantitativ mit dem zu detektierenden Protein. Als Substrat der Peroxidase wird Luminol verwendet. Luminol emittiert bei Oxidation kleine aber anhaltende Mengen Licht. Diese Chemilumineszenz erlaubt die Detektion der Signale mittels eines Autoradiographiefilms.

Imunoblotting:

	EGF-Rezeptors (170 kD)	β-Actin
Blocken	30min in 3%iger fettfreier Milchpulver-PBS-Lösung (Richfood Instant Nonfatmilk)	Über Nacht bei 4°C in Blockpuffer (10%ige fettfreie Milchpulver-PBS/Tween20-Lösung) geschwenkt
Waschen	Kurz in PBS	Kurz in PBS/Tween20 (0,05%)
Primärer Antikörper	Antikörper Schaf in der Verdünnung 1:1000 (Biomol Nr.: 06-129) in 3%iger fettfreier Milchpulver-PBS-Lösung über Nacht bei 4°C	Monoclonal Anti-β-Actine Clone AC-15 (Maus Ascitis Fluid No.: A5441, Sigma) verdünnt 1:10 000 gelöst in 2%iger fettfreier Milchpulver-PBS-Lösung) für 1h
Waschen	30min in destilliertem Wasser	Viermal 5min in PBS/Tween20 (0,05%)
Sekundärer Antikörper	Anti-Schaf-AK Verdünnung: 1:2000 (Biomol Nr.: 12-342) gelöst in 3%iger fettfreier Milchpulver-PBS-Lösung für 90min	Anti-Maus Ig (Horsradish peroxidase linked, Nr.:Na 931) Verdünnung von 1:1000 in 5%iger fettfreier Milchpulver-PBS/Tween20-Lösung für 60min
Waschen	Zweimal in destilliertem Wasser, dann dreimal für 15min in PBS/Tween20 (0,05%) und im Anschluss viermal in destilliertem Wasser waschen	Unter mehrmaligem Wechseln der PBS/Tween20-Lösung (0,05%) 90-120min

Abbildung 11: Übersicht über den Ablauf des Immunoblottings

2.6.5 Auswertung mit der ECL (*Enhanced Chemo Luminescence*) - Detektion

Die getrocknete Nitrozellulosemembran wurde mit ECL-Reagenzien (jeweils zu gleichen Teilen ELC 1 und 2) gleichmäßig besprüht und 1min inkubiert. Die Lumineszenz belichtete einen Autoradiographie-Film (Hyperfilm ECL / Amersham) der später im Röntgenentwickler entwickelt wurde. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 30sec und 3min.

2.6.6 Westernblotansätze

Evaluiert werden sollte der Einfluss von Hungermedium (ohne fetales Kälberserum) [RPMI- Medium 375ml, 1640 mit Glutamine Fa: GIBCO Cat. No.: 041-01875 M; 125ml Duplecco`s MEN 25 MM Hepes; Fa: GIBCO Cat. No.: 041-02320 M; 5ml L- Glutamin 200mM] auf die Inkubation mit zweifacher IC₅₀ Gefitinib- Konzentration und zusätzlich der Einfluss der EGF-Stimulation (50µg/ml) auf die EGFR-Proteinexpression der Zelllinie A253.

Es wurden drei Doppelansätze mit und ohne EGF-Stimulation verglichen. Im ersten Doppelansatz wurde RPMI-Medium, im zweiten Hungermedium und im dritten Hungermedium mit einer Gefitinib-Konzentration von zweifacher IC₅₀ eingegeben. Nach 24h Inkubation bei 37°C wurde jeweils einer der Doppelansätze mit EGF stimuliert. Dazu wurde das Medium abgekippt, einmal mit PBS-Puffer gewaschen und dann mit 5ml EGF 50µg/ml für 5min bei 37°C inkubiert.

2.6.7 Übersicht über die Ansätze

- | | |
|------------------------|---|
| Doppelansatz 1: | A.) Behandlung mit RPMI-Medium für 24h
B.) Behandlung mit RPMI-Medium für 24h, anschließend fünfminütige Stimulation mit EGF |
| Doppelansatz 2: | A.) Behandlung mit Hungermedium für 24h
B.) Behandlung mit Hungermedium für 24h, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF |
| Doppelansatz 3: | A.) Behandlung mit Hungermedium und zweifacher IC ₅₀ Gefitinib für 24h
B.) Behandlung mit Hungermedium und zweifacher IC ₅₀ Gefitinib, anschließend fünfminütige Stimulation mit EGF |

2.6.8 Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Vorbehandlung

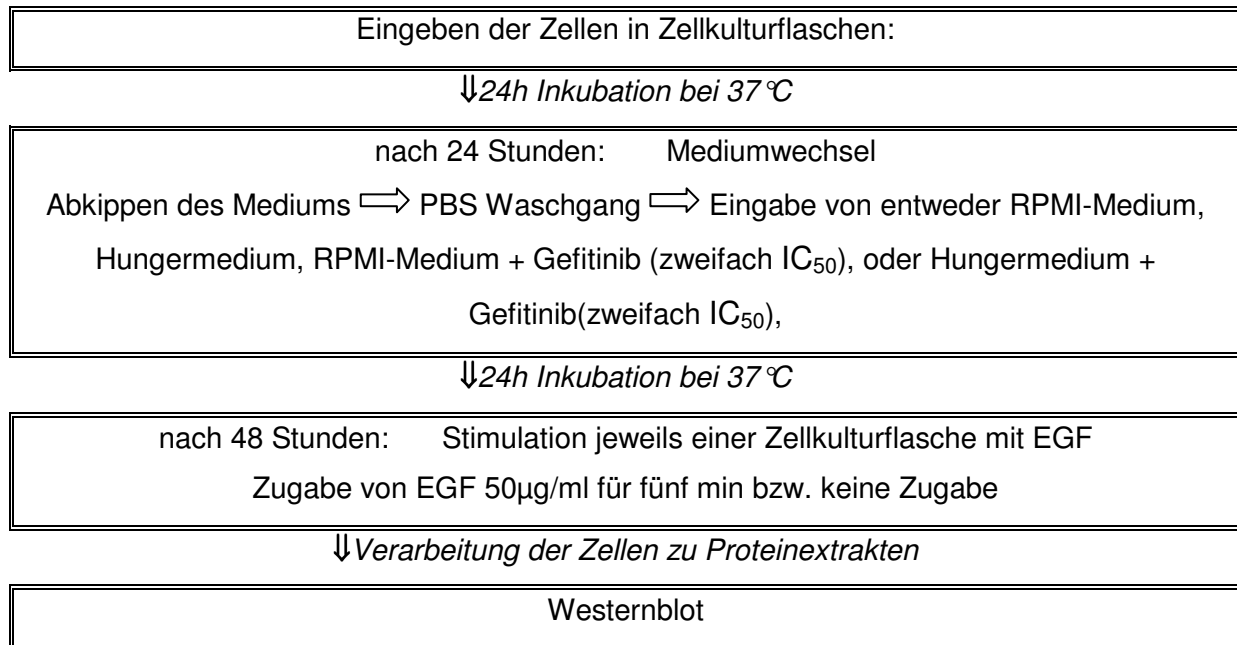


Abbildung 12: Übersicht über den Ablauf des Westernblot

2.7 Testprinzip der Reversen Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR dient der selektiven Amplifizierung spezifischer RNA-Sequenzen. Dieses Verfahren ermöglicht, durch bekannte Primer (Oligonukleotide), Gene auf dem RNA-Strang aufzufinden, in DNA umzuschreiben, dann zu vervielfältigen und somit aus sehr geringen Mengen RNA - im µg Bereich - detektierbare Mengen DNA des gewünschten Gens zu gewinnen.

2.7.1 RNA Isolierung

Für die RT-PCR wurden nur Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Diese wurden zunächst mit Trypsin abgelöst und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Das so entstandene Zellpellet wurde mit Trizol - Reagenz (No.: 15596, Gibco) durch wiederholtes Resuspendieren homogenisiert. Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur und wiederholtem maschinelltem Schütteln der Probe wurden 0,2ml Chloroform hinzugegeben, die Lösung per Hand 15sec stark geschüttelt und 3min bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Gemisch wurde 5min bei 10.000g und 4°C zentrifugiert. Die dabei entstandene obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, dann mit 0,5ml Isopropanol versetzt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei präzipitierte die RNA und konnte nach 10-minütiger Zentrifugation (10.000g in der 4°C) als gelähnliches Pellet vom Rest getrennt werden. Das RNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen (mindestens 1ml Ethanol pro 1ml Trizol) und zentrifugiert (5min bei 7.500g und 4°C). Im letzten Schritt wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (Speed vac) vom Ethanol getrennt und getrocknet.

Das RNA-Pellet wurde danach mit 20µl Diethylpyrocarbonat (DePC) behandeltem Wasser aufgenommen. DePC bindet über seine beiden Ethylreste Amine und inhibiert dadurch das aktive Zentrum der RNAsen.

2.7.2 Messung der RNA-Konzentration

Die Probe wurde auf 1:500 verdünnt und bei 260nm und 280nm im Spektralfotometer (Shimadzu UV 260) gemessen. Durch die Formel: $\text{Absorption bei } 260\text{nm} \times 40 \times \text{Verd.-fkt.} = \text{RNA}(\mu\text{g/ml})$ konnte der RNA Gehalt bestimmt werden. Der Reinheitsgrad, [Ratio: UV260/UV280]

also das Verhältnis von Nukleinsäure zu Protein, sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.7.3 Versuchsablauf

Für jeden Versuch wurde in mit DePC behandelten Wasser, Ethanol und Natriumacetat bei -80°C eingefrorene RNA verwendet. Diese wurde zunächst bei 10.000g und 4°C 10min zentrifugiert und gleichzeitig aufgetaut, der Überstand verworfen und das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen. Dazu wurde das maschinell geschüttelte Eppendorfcup 10min bei 4°C und 7.500g zentrifugiert.

Das vakuumgetrocknete Pellet konnte danach mit DePC behandeltem Wasser auf eine Konzentration von 1µg/µl gebracht werden.

2.7.4 Reverse Transkription

Alle Schritte im Zusammenhang mit RNA wurden auf Eis und mit RNase- und DNase-freiem Material durchgeführt.

Als Erstes wurde ein Mastermix entsprechend den Angaben des PCR-Kit Herstellers angefertigt. Die Bestandteile waren: 25mM MgCl₂, zehnmal RT-PCR-Puffer (Glico), DePC-Wasser, dGTP, dATP, dTTP, dCTP (GeneAmp RNA CoreKit PartNo. N808-

0143), RNase-Inhibitor, MuLVRev.Transkriptase, Random Hexamere (Primer). Zu 19µl der Mastermix wurde je 1µl Probe pipettiert und das Gemisch 10min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die reverse Transkription wurde nun in einem Thermocycler (Gene Amp Perkin-Elmer Thermocycler, System 2400) durchgeführt. Ein Zyklus bestand aus 20min bei 42°C (*Annealing/Elongation*), dann 5min bei 99°C (*Inaktivierung of RT*) und 5min bei 5°C (*Cooling*).

Gesamtvolumen 20µl		
„Annealing“/“Elongation“	Inaktivierung der RT	Kühlung
20min/ 42°C	5min/ 99°C	5min/ 5°C
1 Zyklus		

Abbildung 13: Übersicht über die reverse Transkription

Die nun in DNA umgeschriebene RNA wurde jetzt im zweiten Schritt der Polymerasekettenreaktion zugeführt.

Dazu wurde ein Mastermix angefertigt in dem 25mM MgCl₂, 10 x RT-PCR-Puffer, DePC behandeltem Wasser, Ampli Taq DNA Polymerase, Sense und Antisense Primer - je nach zu detektierender Sequenz spezifisch für EGF-Rezeptor oder β-Actine – zugesetzt wurden.

EGFR: Sense Primer: 5`-GGCTCCGGTGCGTTCGGCACGGTG-3`

Antisense Primer: 5`-CTGCGTCTATCAGCGGGTTTCAAG-3`

β-Actin Sense Primer: 5`-AAGATGACCCAGATCATGTTTGAG-3`

Antisense Primer: 5`-AAGAGGAGCAATGATCTTGATCTT-3`

Zu jeder Probe aus der vorangegangenen reverse Transkriptase-Reaktion wurden 80µl des Mastermix zugegeben. Die RT-PCR wurde nun im Thermocycler durchgeführt.

	Erster Schritt	Denaturierung	Annealing	Elongation	Letzter Schritt	Kühlung
EGFR	1,45 min/95°C	1min/93,5°C	1min/55°C	1min/72°C	7min/72°C	∞ /4°C
β-Actin	1,45 min/95°C	1min/93,5°C	1min/55°C	1min/72°C	7min/72°C	∞ /4°C
			x-Zyklen			

Abbildung 14: Übersicht über die RT-PCR

Je nach zu detektierender DNA wurden 30 Zyklen für den EGF-Rezeptor oder 28 Zyklen für β -Actin durchlaufen.

2.7.5 Gelelektrophorese

Das RT-PCR-Produkt wurde in einem 2%igen Agarosegel bei 100V für 1,5-2h aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet.

Vor Beginn wurden 27 μ l der Probe mit 3 μ l Ladepuffer Stop Solution [0,1M EDTA; 1%iges SDS, 50%iges Glycerol, 0,1%iges Bromphenolblau] zusammengegeben.

Zur Bestimmung der Basenlänge wurden 8 μ l DNA Mass Ladder 100-2000bp (Cat No. 10068-013; Gibco BRL) mit 2 μ l Ladepuffer versehen und neben den Proben aufgetragen.

Nach dem Laufvorgang wurde das Gel mit 15 μ l Ethidiumbromid (10mg/100ml) in 150ml destilliertem Wasser für 20min gefärbt. Nach 30-60min Waschen in destilliertem Wasser konnte mit Hilfe von UV-Licht bei 302nm in einer Dunkelkammer ein Polaroidphoto aufgenommen werden.

2.7.6 Versuch RT-PCR

Es wurden drei Doppelansätze verglichen, bei denen jeweils EGF-Rezeptor und β -Actine bestimmt wurden. Es sollte der Einfluss von Hungermedium, Hungermedium mit der Konzentration zweifach IC_{50} Gefitinib und dem zusätzlichen Einfluss der Stimulation der Zellen mit dem *Epidermal-growth-factor* (50 μ g/ml) untersucht werden. Wie im Westernblotansatz ergaben sich folgende Ansätze:

- Doppelansatz 1:**
- A.) Behandlung mit RPMI-Medium für 24h
 - B.) Behandlung mit RPMI-Medium für 24h, anschließend fünfminütige Stimulation mit EGF
- Doppelansatz 2:**
- A.) Behandlung mit Hungermedium für 24h
 - B.) Behandlung mit Hungermedium für 24h, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF
- Doppelansatz 3:**
- A.) Behandlung mit Hungermedium und zweifacher IC_{50} Gefitinib für 24h
 - B.) Behandlung mit Hungermedium und zweifacher IC_{50} Gefitinib, anschließend fünfminütige Stimulation mit EGF

2.7.7 Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Vorbehandlung der Zellen

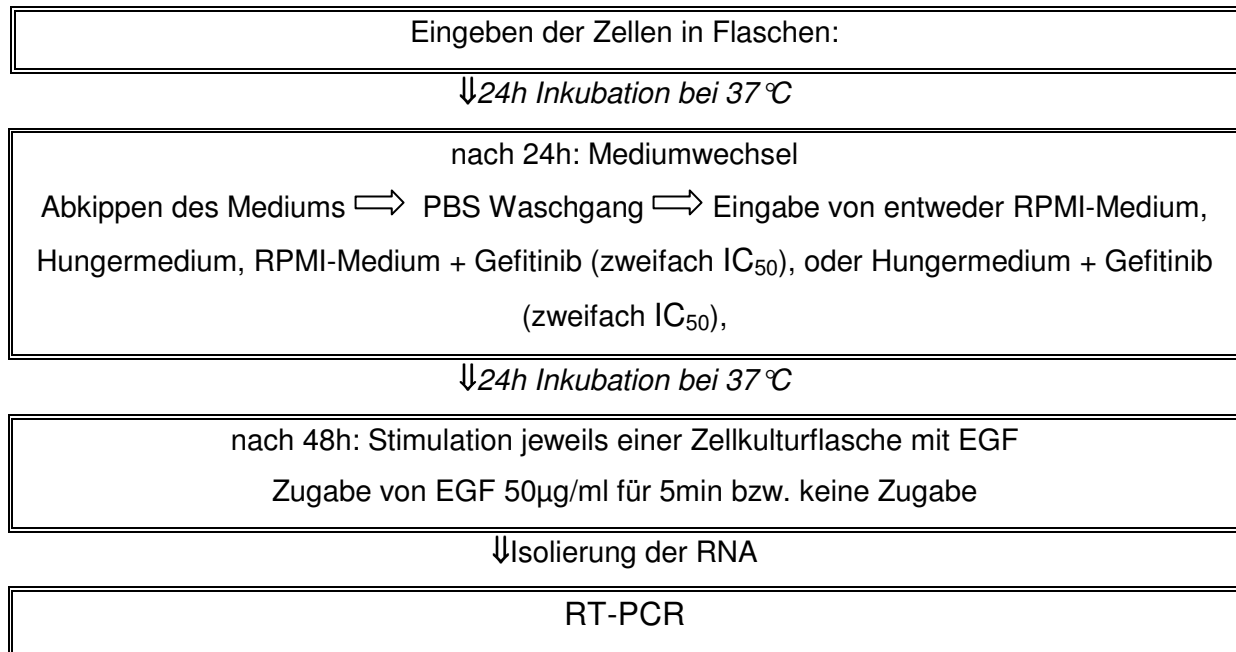


Abbildung 15: Übersicht über die Vorbehandlung der Zellen für die RT-PCR

2.8 Statistische Methoden

Bei der Auswertung der Wachstumskinetiken erhielt der Mittelwert der gemessenen Absorptionen nach 24h die relative Einheit 1. Anschließend wurden alle weiteren Absorptionswerte nach 48, 72, 96, 120 und 144h in Relation zu dem nach 24h ermittelten Mittelwert gesetzt und erhielten entsprechend relative Einheiten. Die Standardabweichung aller Messwerte wurde berechnet. Diese Umrechnungen sind erforderlich, um die Vergleichbarkeit der Dreifachbestimmungen bei unterschiedlichen Absorptionswerten zu gewährleisten.

Zur Auswertung der Zytotoxizitätsbestimmungen wurde bei jedem Versuch der Mittelwert der Absorptionen der Kontrollgruppe gebildet. Dieser Wert entsprach einem prozentualen Wachstum von 100%.

Die Absorptionen der verschiedenen Zytostatikakonzentrationen wurden als prozentualer Anteil an der Wachstumskontrolle angegeben.

Nach drei Versuchen erfolgte die Zusammenfassung aller 18 Prozentwerte zu einem Mittelwert, dessen Standardabweichung berechnet wurde.

Folgende Formeln wurden verwendet:

Formel für den Mittelwert:

$$MW = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Formel für die Standardabweichung:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - MW)^2}{n - 1}}$$

Dabei entspricht n der Anzahl der Messwerte und x_i dem aktuellen Messwert.

Für das Signifikanzniveau wurde der Students t-Test mit Hilfe von Graphpad verwendet.

3 Ergebnisteil

3.1 Wachstumskinetik mit der Zelllinie A253

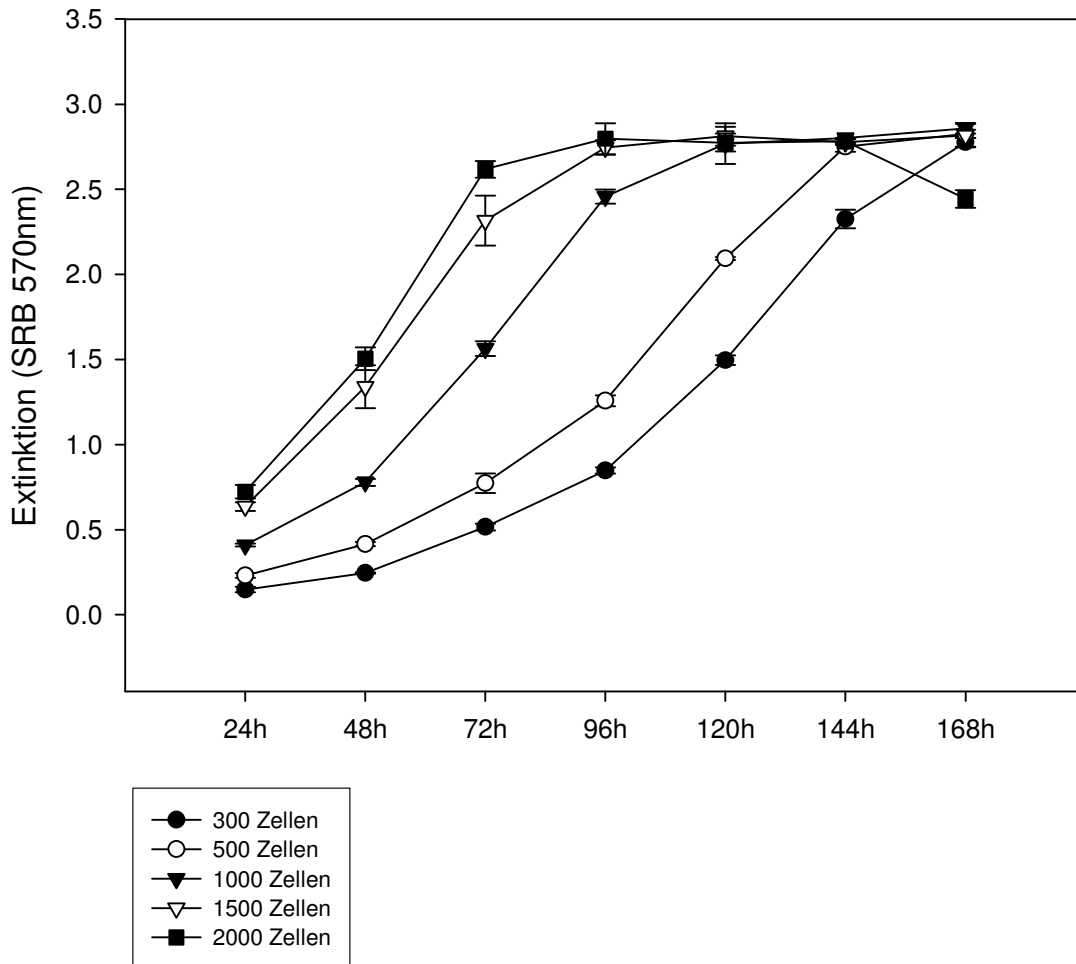


Abbildung 16: Wachstumskinetik der Zelllinie A253

Die abgebildete Grafik zeigt eine Wachstumskinetik der Zelllinie A253. Die Kurven in der Grafik verdeutlichen jeweils die am Zeitpunkt 0 eingegebene Zellzahl von 300, 500, 1000, 1500 und 2000 Zellen. Die erste Messung wurde nach 24h, die nächsten jeweils 24h später durchgeführt.

Die Grafik zeigt, dass bei einer Eingabezahl von 2000 Zellen bereits nach 48 Stunden ein Wachstumsplateau erreicht ist und somit keine ausreichende Zellproliferation mehr stattfindet. Bei Zugabe eines Zytostatikums würde in diesem Fall nicht nur der Zytostatikaeffekt, sondern auch die natürliche Plateauphase der

Zelle gemessen. Erst die Eingabe von 500-1.000 Zellen zeigt über 120h proliferatives Wachstum.

3.2 Zytotoxizitätstests

In den Zytotoxizitätstests wurde die IC_{50} der Zelllinie A253 für Cisplatin, Carboplatin, Paclitaxel, Irinotecan und Gefitinib (für Inkubationszeiten von 24h und 120h) eruiert.

3.2.1 Cisplatin

Cisplatin wurde in einer Konzentration von 33nM-333 μ M in acht Verdünnungsschritten verwendet. Es zeigte sich in 3 unabhängigen Versuchen mit je 9 Messpunkten ein Mittelwert der IC_{50} von 0,74 μ M.

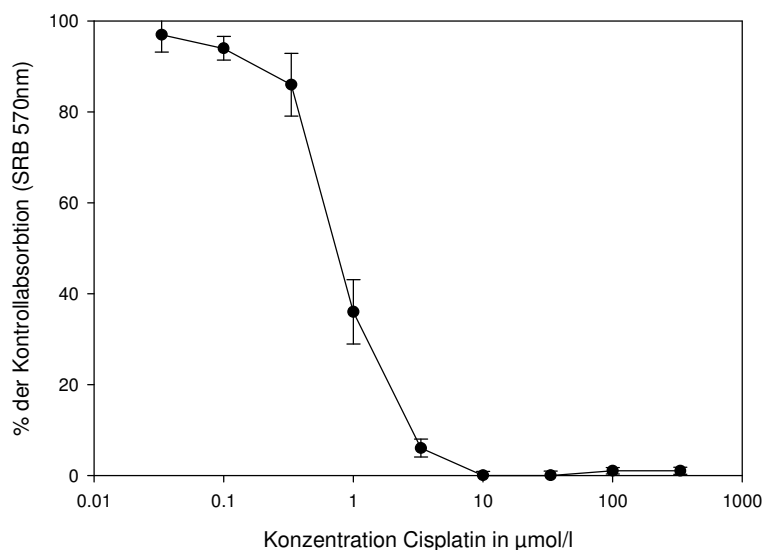


Abbildung 17: Zytotoxizitätskurve Cisplatin 33nM-333 μ M der Zelllinie A253

3.2.2 Carboplatin

Carboplatin wurde in Konzentrationsschritten von 33nM-333µM in 7 Verdünnungsschritten aufgegeben. Es zeigte sich in 3 unabhängigen Versuchen mit je 7 Messpunkten ein Mittelwert der IC_{50} von 17µM.

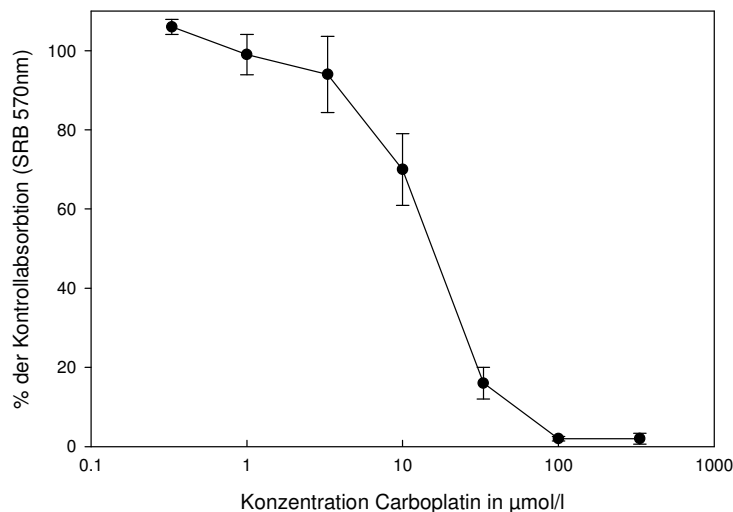


Abbildung 18: Zytotoxizitätskurve Carboplatin 33nM-333µM der Zelllinie A253

3.2.3 5-Fluorouracil

5-Fluorouracil wurde in Konzentrationen von 1µM-333µM verwendet. Es zeigte sich in 3 unabhängigen Versuchen mit je 6 Messpunkten ein Mittelwert der IC_{50} von 28µM.

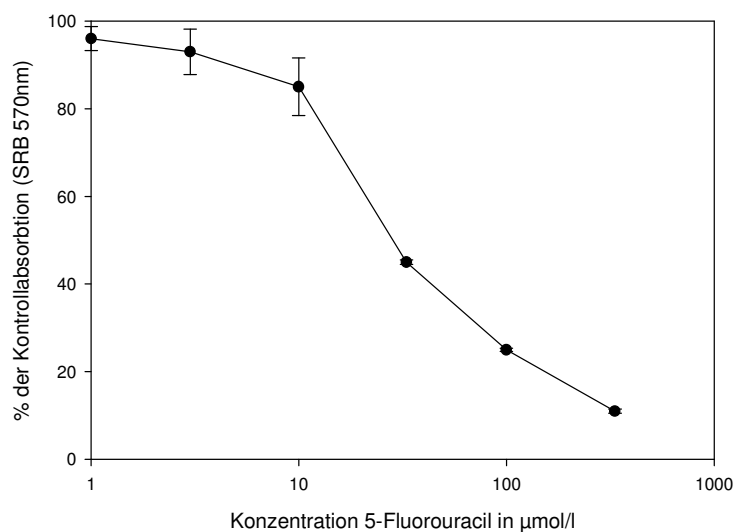


Abbildung 19: Zytotoxizitätskurve 5-Fluorouracil 1µM-333µM der Zelllinie A253

3.2.4 Irinotecan

Irinotecan wurde in Konzentrationen von 0,1nM-0,33 μ M verwendet. Es wurden 7 Verdünnungsschritte aufgetragen. Es zeigte sich in 3 unabhängigen Versuchen mit je 8 Messpunkten ein Mittelwert der IC₅₀ von 12nM.

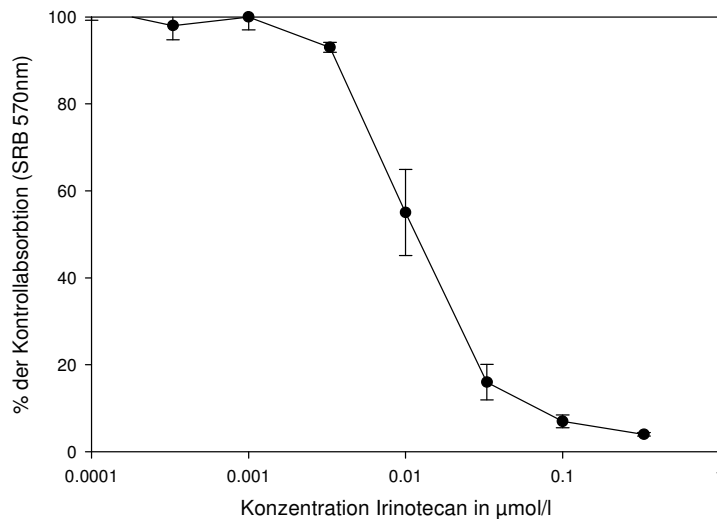


Abbildung 20: Zytotoxizitätskurve Irinotecan 0,1nM-0,33 μ M der Zelllinie A253

3.2.5 Paclitaxel

Paclitaxel (Taxol) wurde in Konzentrationen von 0,33nM-1 μ M verwendet. Es wurden 8 Verdünnungsschritte aufgetragen. Es zeigte sich in 3 unabhängigen Versuchen mit je 7 Messpunkten ein Mittelwert der IC₅₀ von 2,8nM.

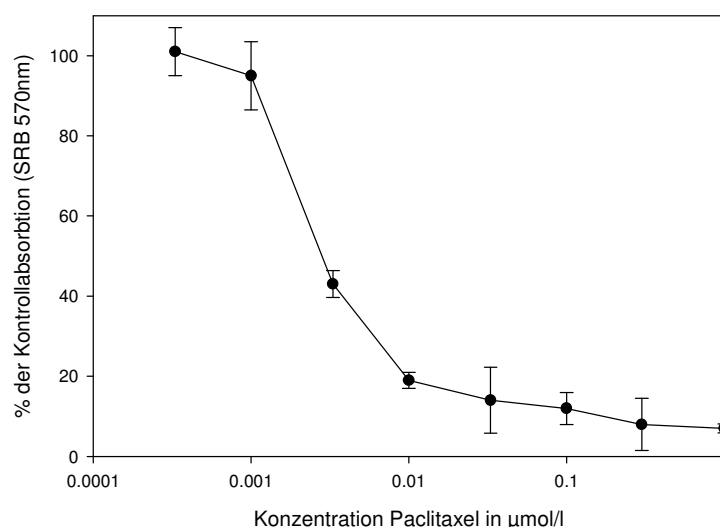


Abbildung 21: Zytotoxizitätskurve Paclitaxel 0,33nM-1 μ M der Zelllinie A253

3.2.6 Gefitinib 24h

Gefitinib wurde in 7 Konzentrationsschritten von 33nM-100µM in 8 Konzentrationen aufgegeben. Es zeigte sich in 3 unabhängigen Versuchen mit je 8 Messpunkten ein Mittelwert der IC₅₀ von 14µM.

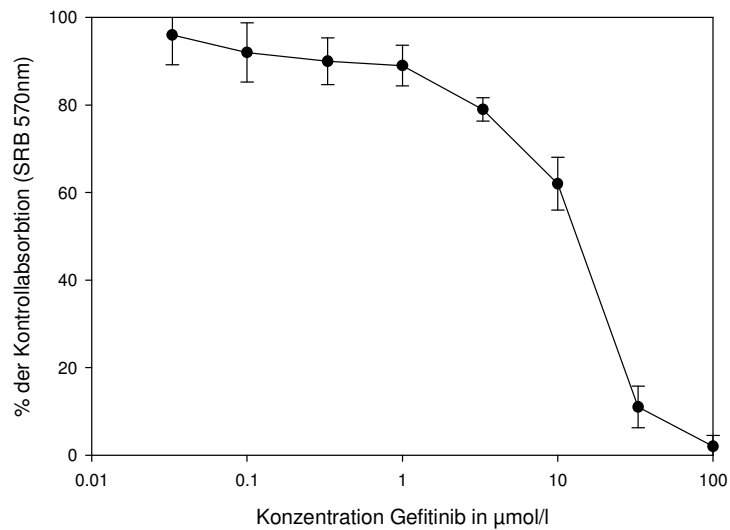


Abbildung 22: Zytotoxizitätskurve Gefitinib 24h 0,033µM-100µM

3.2.7 Gefitinib 120h

Gefitinib wurde in 6 Konzentrationsschritten von 33nM-33µM in 7 Verdünnungsschritten aufgegeben. Bei diesem Versuchsansatz wurden die Zellen für 120h mit dem Zytostatikum inkubiert. Es zeigte sich in 3 unabhängigen Versuchen mit je 8 Messpunkten ein Mittelwert der IC_{50} von 1µM

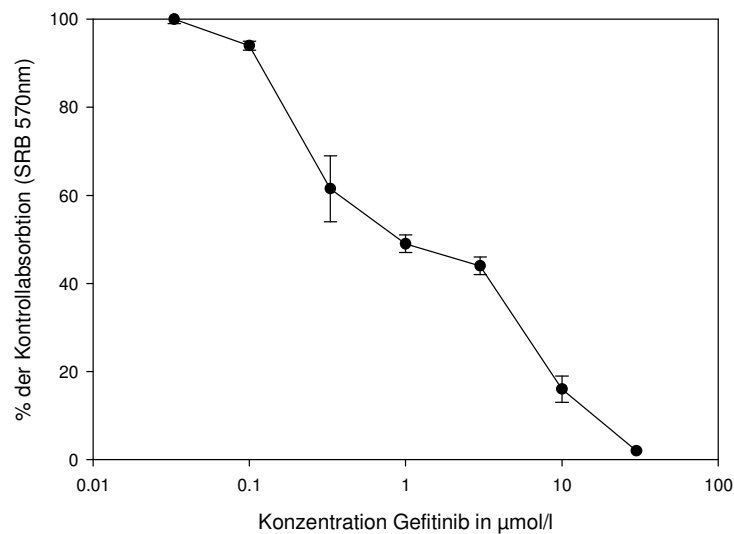


Abbildung 23: Zytotoxizitätskurve Gefitinib 120h 33nM-33µM

3.2.8 Zusammenfassung

Die folgende Tabelle zeigt die IC_{50} der getesteten Zytostatika:

Medikament	IC_{50} der Zelllinie A 253 in µmol/l
Cisplatin	0,73
Carboplatin	17
5-Fluorouracil	28
Irinotecan	0,012
Paclitaxel	0,0028
Gefitinib 24h	14
Gefitinib 120h	1

Abbildung 24: IC_{50} der getesteten Zytostatika in µmol/l

3.3 Interaktion von Gefitinib in subtoxischen Konzentrationen

In einem Dreifachansatz wurde die Interaktion von Gefitinib in subtoxischen Konzentrationen ($\frac{1}{4}$ oder $\frac{1}{8}$ IC_{50} Gefitinib) mit Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Paclitaxel untersucht.

3.3.1 Cisplatin

Für die Zellen, die nicht mit Gefitinib behandelte wurden, ergab sich ein Mittelwert der IC_{50} von $0,76\mu M$ für Cisplatin. In einer Kombination mit Gefitinib ($\frac{1}{4}$ der IC_{50}) ergab sich eine mittlere IC_{50} von $0,74\mu M$, bei der Kombination von Cisplatin mit $\frac{1}{8}$ der IC_{50} von Gefitinib lag der Mittelwert der IC_{50} bei $0,75\mu M$.

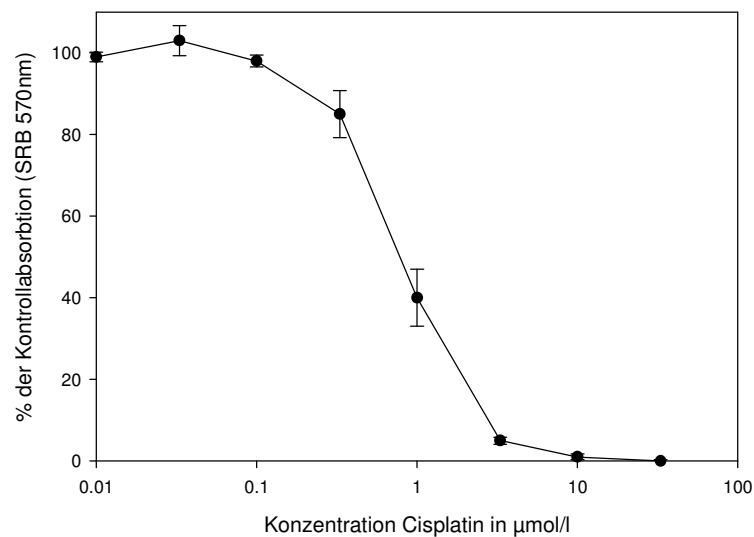


Abbildung 25: Zytotoxizitätskurve Cisplatin der Zelllinie A253

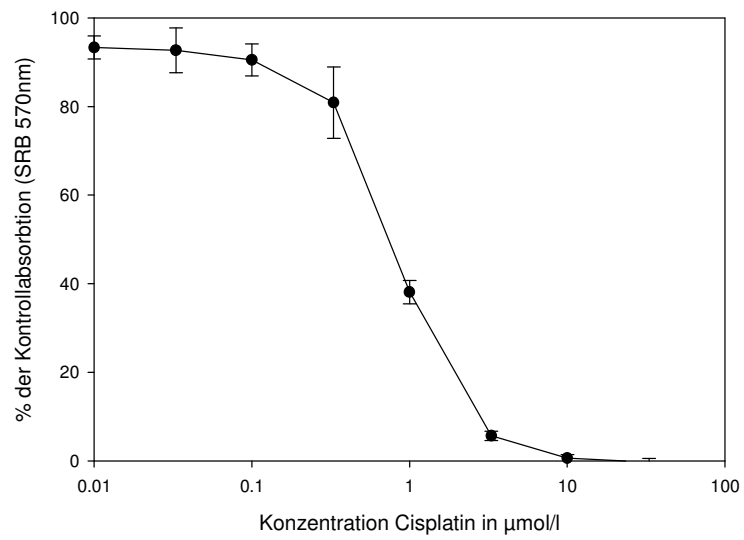


Abbildung 26: Zytotoxizitätskurve Cisplatin + $\frac{1}{4}$ der IC₅₀ Gefitinib der Zelllinie A253

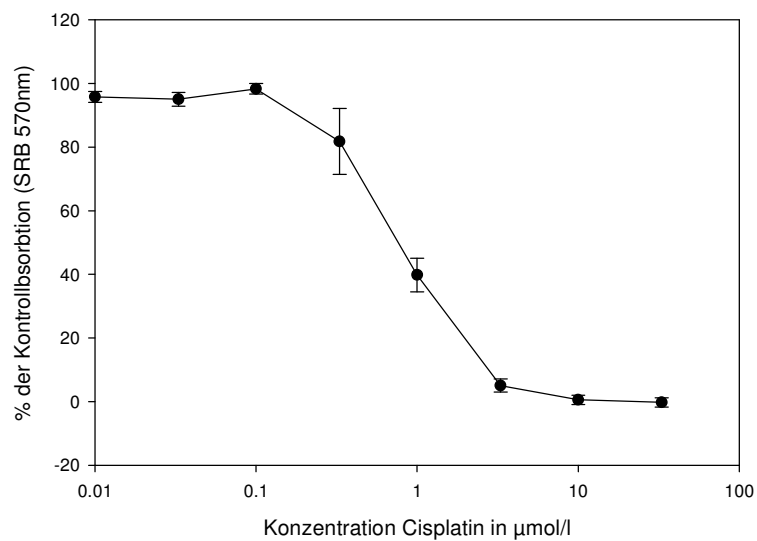


Abbildung 27: Zytotoxizitätskurve Cisplatin + $\frac{1}{8}$ der IC₅₀ Gefitinib der Zelllinie A253

3.3.2 Carboplatin

In dieser Konstellation ergab sich für die nicht mit Gefitinib behandelten Zellen ein Mittelwert der IC_{50} von $17\mu M$ für Carboplatin. In der Kombination mit Gefitinib $\frac{1}{4} IC_{50}$ lag die mittlere IC_{50} bei $16\mu M$.

Bei einer Kombination von Carboplatin und $\frac{1}{8} IC_{50}$ Gefitinib ergab sich ein Mittelwert der IC_{50} von $16\mu M$.

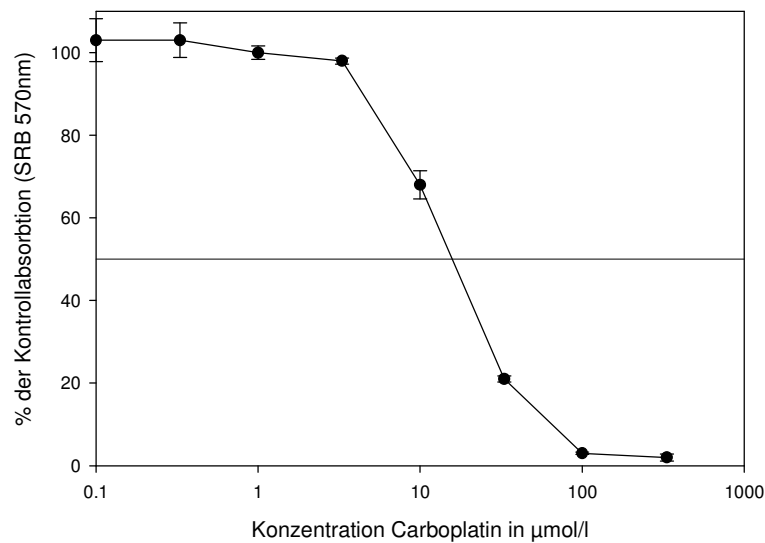


Abbildung 28: Zytotoxizitätskurve Carboplatin der Zelllinie A253

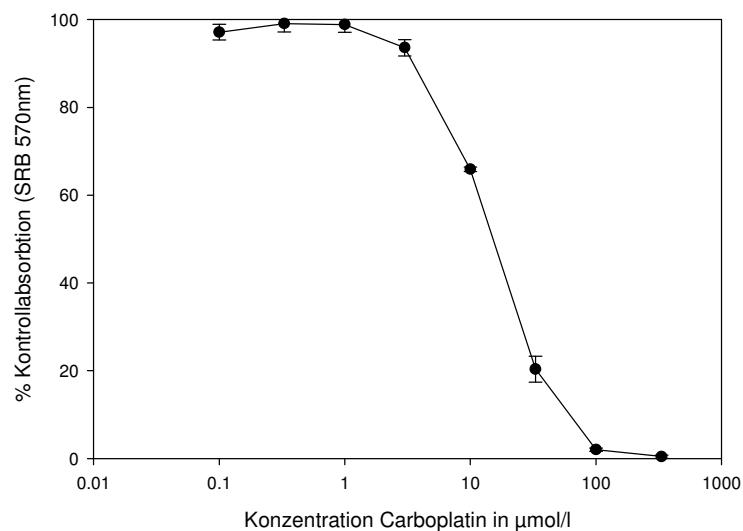


Abbildung 29: Zytotoxizitätskurve Carboplatin + $\frac{1}{4}$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253

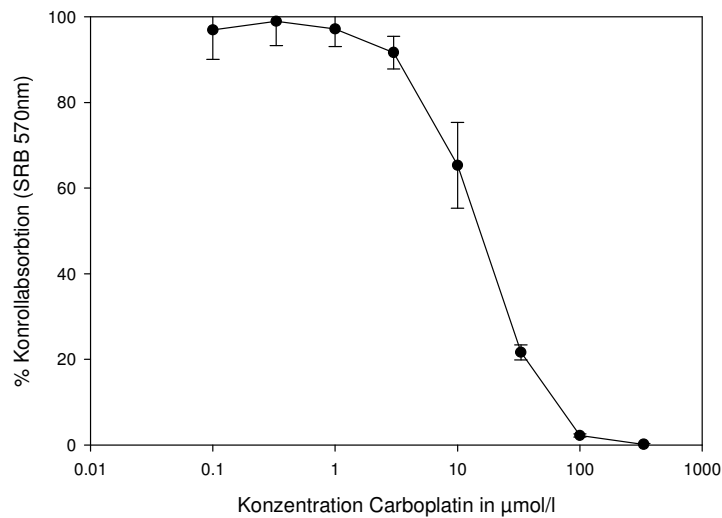


Abbildung 30: Zytotoxizitätskurve Carboplatin + $\frac{1}{8}$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253

3.3.3 5-Fluorouracil

Für die nicht mit Gefitinib behandelten Zellen ergab sich ein Mittelwert der IC_{50} von 5-Fluorouracil von $33,3\mu\text{M}$. In einer Kombination mit Gefitinib $\frac{1}{4} \text{IC}_{50}$ zeigte sich eine mittlere IC_{50} von $27,6\mu\text{M}$.

Bei einer Kombination von 5-Fluorouracil und $\frac{1}{8} \text{IC}_{50}$ Gefitinib lag der Mittelwert der IC_{50} bei $27,3\mu\text{M}$.

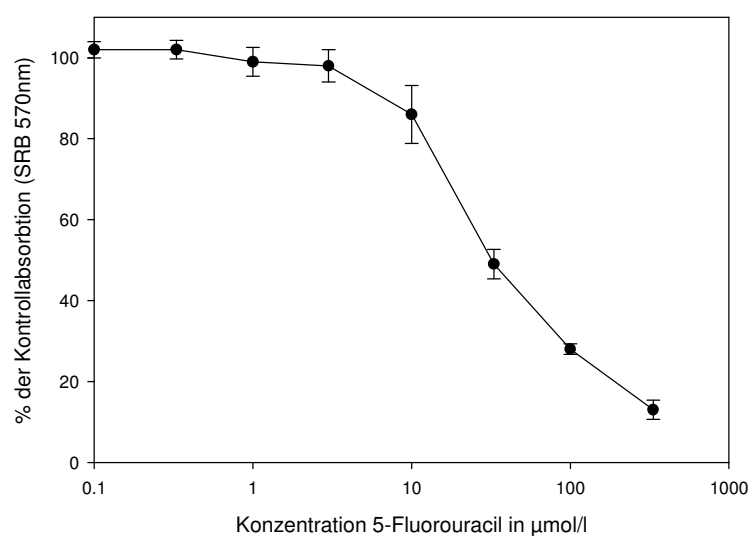


Abbildung 31: Zytotoxizitätskurve 5-Fluorouracil der Zelllinie A253

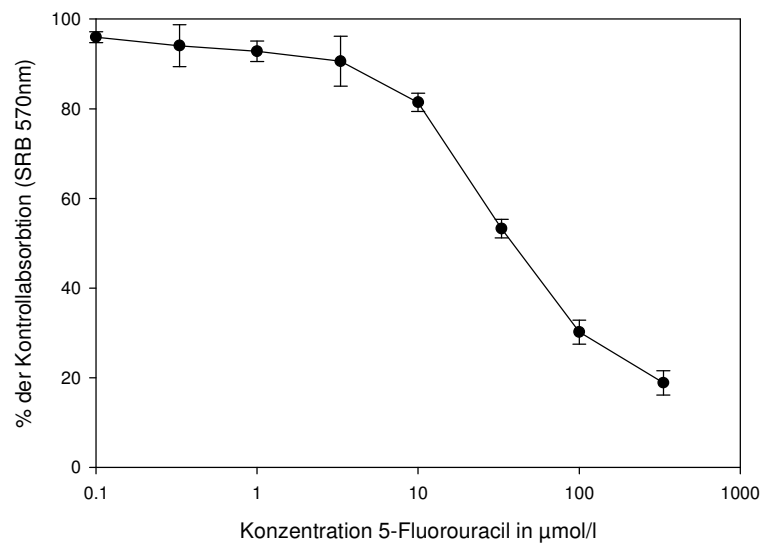


Abbildung 32: Zytotoxizitätskurve 5-Fluorouracil + $\frac{1}{4}$ der IC₅₀ Gefitinib der Zelllinie A253

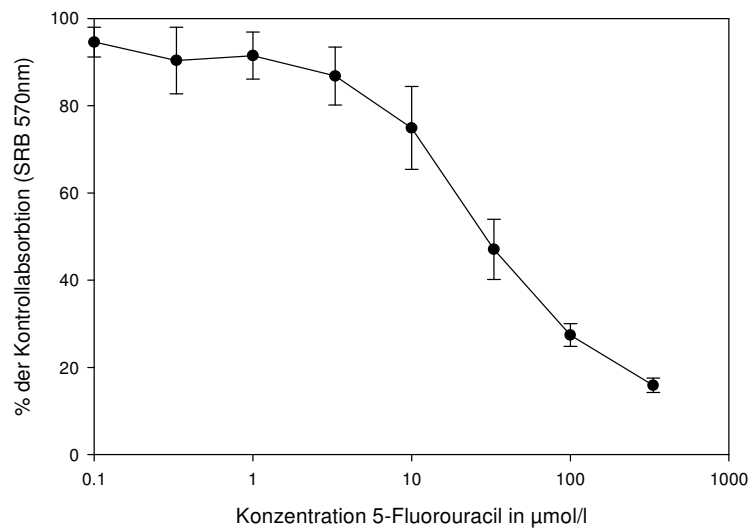


Abbildung 33: Zytotoxizitätskurve 5-Fluorouracil + $\frac{1}{8}$ der IC₅₀ Gefitinib der Zelllinie A253

3.3.4 Irinotecan (SN38)

Bei den nicht mit Gefitinib behandelten Zellen lag der Mittelwert der IC_{50} für Irinotecan bei 9,4nM. In einer Kombination mit $\frac{1}{4}$ IC_{50} Gefitinib ergab sich eine mittlere IC_{50} von 5,8nM. Bei einer Kombination von SN38 und $\frac{1}{8}$ IC_{50} Gefitinib zeigte sich ein Mittelwert der IC_{50} von 6,8nM.

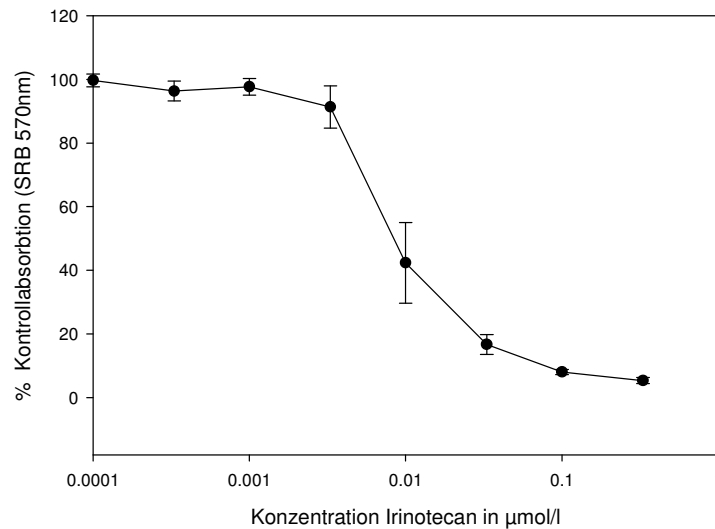


Abbildung 34: Zytotoxizitätskurve Irinotecan der Zelllinie A253

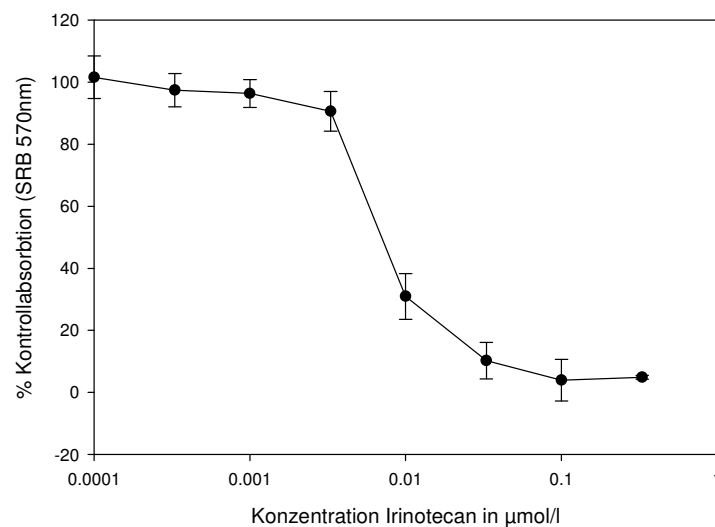


Abbildung 35: Zytotoxizitätskurve Irinotecan + $\frac{1}{4}$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253

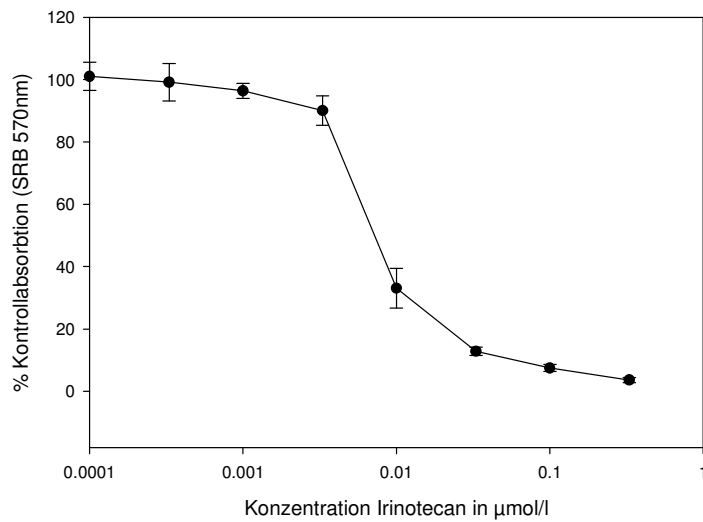


Abbildung 36: Zytotoxizitätskurve Irinotecan + $\frac{1}{8}$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253

3.3.5 Paclitaxel

Bei den nicht mit Gefitinib behandelten Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen Paclitaxel ergab sich Mittelwert der IC_{50} von 3,35nM. In einer Kombination mit $\frac{1}{8}$ IC_{50} Gefitinib ergab sich eine Mittlere IC_{50} von 2,9nM. In der Kombination Paclitaxel und $\frac{1}{4}$ IC_{50} ergab sich ein Mittelwert der IC_{50} von 2,3nM.

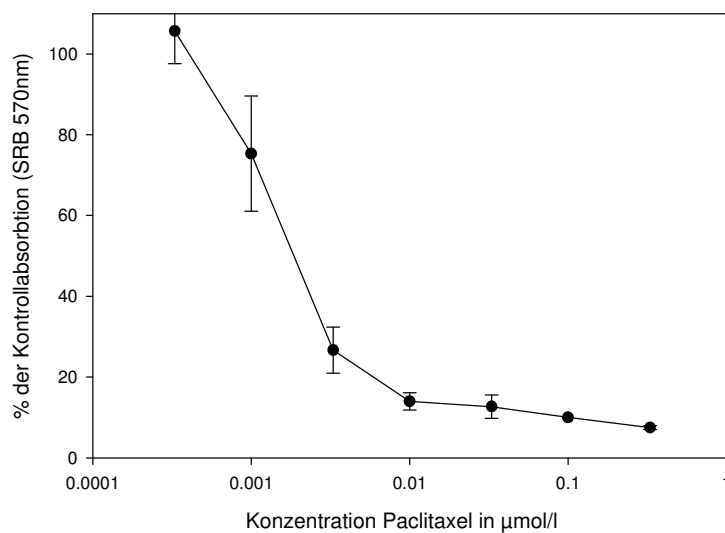


Abbildung 37: Zytotoxizitätskurve Paclitaxel der Zelllinie A253 µmol/l

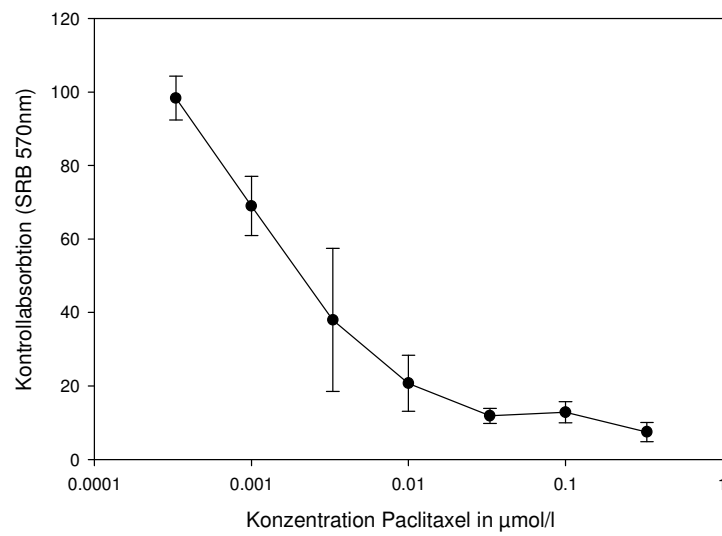


Abbildung 38: Zytotoxizitätskurve Paclitaxel + $\frac{1}{4}$ der IC₅₀ Gefitinib der Zelllinie A253

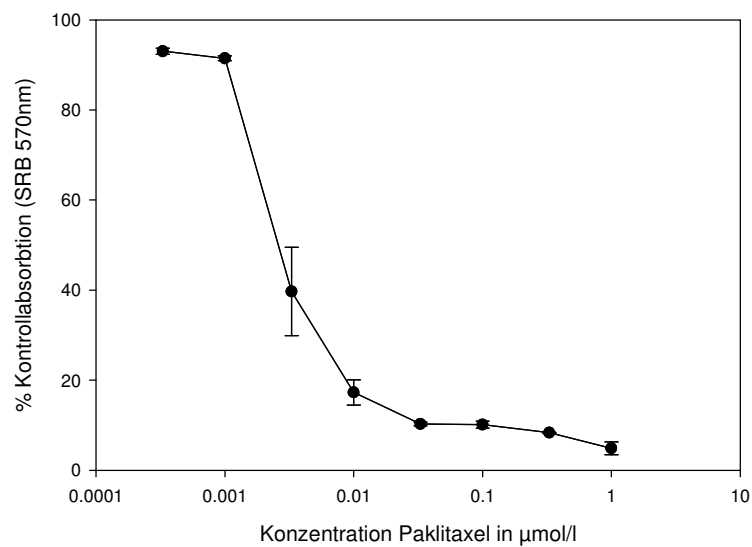


Abbildung 39: Zytotoxizitätskurve Paclitaxel + $\frac{1}{8}$ der IC₅₀ Gefitinib der Zelllinie A253

3.3.6 Zusammenfassung

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte der Ergebnisse der Interaktion von Gefitinib in einer Konzentration von $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{8}$ IC_{50} mit Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Irinotecan, Paclitaxel zusammengefasst. Der durchgeführte Student t-Test zeigt jeweils keine signifikante Änderung der IC_{50} durch die Kombination mit Gefitinib.

Zytostatikum	Zytostatikum ohne Gefitinib	$\frac{1}{8}$ IC_{50} Gefitinib	P	$\frac{1}{4}$ IC_{50} Gefitinib	P
Cisplatin	0,76	0,75	0.18	0,74	0.16
Carboplatin	17	16	0.54	16	0.37
5 - Fluorouracil	33,3	27,3	0.42	27,6	0.12
Irinotecan	0,0094	0,0068	0.33	0,0058	0.21
Paclitaxel	0,00335	0,0029	0.88	0,0023	0.69

Abbildung 40: IC_{50} der Kontrollplatten, $\frac{1}{4}$ IC_{50} und $\frac{1}{8}$ IC_{50} in $\mu\text{mol/l}$ der Zelllinie A253

3.4 Westernblot Ergebnisse

Die Auswirkungen der Stimulation der Zelllinie A253 mit dem Epidermal-Growth-Factor (EGF) wurden mit Hilfe des Westernblots untersucht. Dabei wurden drei Bedingungen verglichen. Bei der ersten Bedingung wurden die Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen (RPMI-Medium), im zweiten Ansatz unter Nährstoffmangelbedingungen inkubiert. Die dritte untersuchte Bedingung war, die Inkubation unter Nährstoffmangelbedingungen und Gefitinib. Jede der Bedingungen wurde im Doppelansatz untersucht, wobei ein Ansatz im Anschluss an die Inkubation mit den unterschiedlichen Medien 5min mit EGF stimuliert wurde.

3.4.1 β -Actin-Antikörper

Zunächst wurden die äquivalente Proteinladung mittels β -Actin überprüft. Basierend auf dem Molekulargewicht von β -Actin (42kDa) wurde ein 12%iges SDS-Gel benutzt, dass auch kleine Proteine entsprechend aufgetrennt.

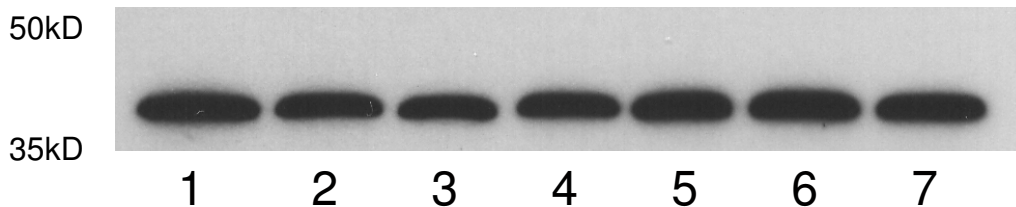


Abbildung 41: Westernblotergebnisse β -Aktin

Die Abbildung zeigt 7 verschiedene Proteinextrakte der Zelle A253 unter unterschiedlichen Bedingungen:

1.) Behandlung mit RPMI-Medium, 2.) Behandlung mit RPMI-Medium, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF, 3.) und 7.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium (zeitgleiche Kontrolle bei Unterschiedlichen Experimenten), 4.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF, 5.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium und einer Konzentration der zweifachen IC_{50} Gefitinib, 6.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium mit zweifacher IC_{50} Konzentration Gefitinib, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF

Wie in Abbildung 41 wiedergegeben, wird die für β -Actin spezifische Bande (42kDa) zwischen den Banden 50kDa und 35kDa des Proteinmarkers detektiert. Es konnte keine Differenz in der Expression des β -Actins verifiziert werden. Es ist daher von einer gleichwertigen Proteinladung der aufgetrennten Lysate auszugehen.

3.4.2 EGF-Rezeptor-Antikörper

Im folgenden Versuch wurden die Proteinextrakte mittels Immunoblot auf die Expression des EGF-Rezeptors untersucht. Um den Molekulargewichtsbereich des EGF-Rezeptors aufzutrennen wurde ein 5% SDS-Gel benutzt.

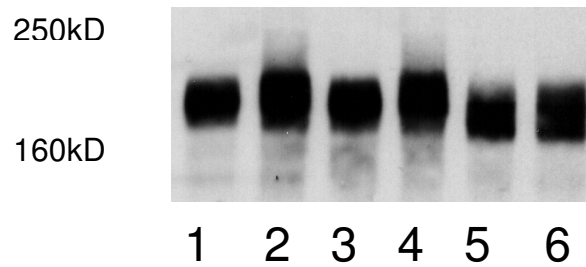


Abbildung 42: Westernblotergebnisse EGFR

Die Abbildung zeigt die Auftrennung der Zelllysate aus folgenden Versuchsansätzen: 1.) Behandlung mit RPMI-Medium, 2.) Behandlung mit RPMI-Medium, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF, 3.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium, 4.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF, 5.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium und zweifacher IC_{50} Gefitinib, 6.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium zweifacher IC_{50} Gefitinib und anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF

Die Abbildung 42 zeigt Proteinbanden auf der gleichen Höhe zwischen 160kDa und 250kDa. Es handelt sich um den EGFR mit einem Molekulargewicht von 170kDa.

Die Proteinbanden 1,3 und 5 zeigen die Ergebnisse der Zelllysate, die nicht mit EGF stimuliert wurden. Die unterschiedlichen Bedingungen mit RPMI, RPMI-Hungermedium oder RPMI-Hungermedium mit zweifacher IC_{50} Gefitinib zeigten keine quantitativen Unterschiede in der Proteinladung der Zelllysate für den EGFR.

Die Banden 2 und 4 zeigen die Zelllysate der A253 Zellen die mit EGF stimuliert wurden. Eine fünfminütige Stimulation mit EGF bewirkte in diesen Experimenten einen sichtbaren qualitativen Shift der detektierten Banden. Auch bei diesen Versuchen konnte kein quantitativer Unterschied der Expression des EGFR zwischen der Behandlung der Zellen mit RPMI-Medium oder RPMI-Hungermedium aufgezeigt werden.

Die Proteinbande 6 zeigt Proteine aus Zelllysaten von A253 Zellen die ebenfalls mit EGF stimulierte wurden. In diesem Versuchsansatz wurden die Zellen mit RPMI-Hungermedium mit zweifacher IC_{50} Gefitinib behandelt und im Anschluss 5 min mit EGF inkubiert. Im Unterschied zu den Banden aus den Experimenten 2 und 4 konnte bei dieser Proteinbande kein qualitativer Shift der EGFR-Expression festgestellt werden.

3.5 RT-PCR-Ergebnisse

3.5.1 Anti- β -Actin-Primer

In diesen Versuchen wurden die Auswirkungen von Hungermedium, Blockade des EGF-Rezeptors mit Gefitinib und die Stimulation der Zelllinie A253 mit EGF auf die RNA-Expression des EGF-Rezeptors untersucht. Es wurden dieselben Versuchsbedingungen verglichen, die bei den Untersuchungen mittels Westernblot untersucht wurden.

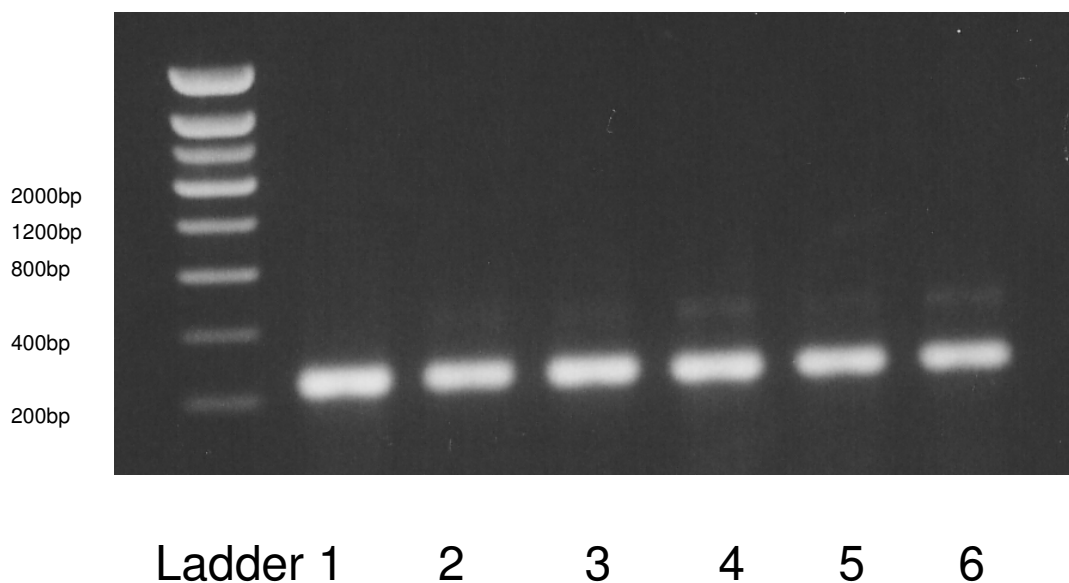


Abbildung 43: RT-PCR-Ergebnisse β -Actin

Die Abbildung zeigt die Detektion der cDNA von β -Actin. Zur Identifizierung der Anzahl der Basenpaare wurde der Smart-Ladder benutzt. 1.) Behandlung mit RPMI-Medium, 2.) Behandlung mit RPMI-Medium, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF, 3.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium, 4.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF, 5.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium mit zweifacher IC_{50} Gefitinib, 6.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium und mit zweifacher IC_{50} Gefitinib und anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF

In der Abbildung 43 sieht man die amplifizierten cDNA-Banden von β -Actin. Es zeigt sich in den unterschiedlichen Ansätzen kein quantitativer Ladungsunterschied zwischen den Banden. β -Actin stellt im Sinne eines „Housekeeping gene“ sicher, dass in den Versuchen vergleichbare DNA-Ladungen eingesetzt wurden.

3.5.2 EGFR Expression

Die in Abbildung 44 dargestellten Banden zeigen das Ergebnis der Detektion der RNA-Extrakte auf den Gehalt von EGFR-RNA mittels RT-PCR.

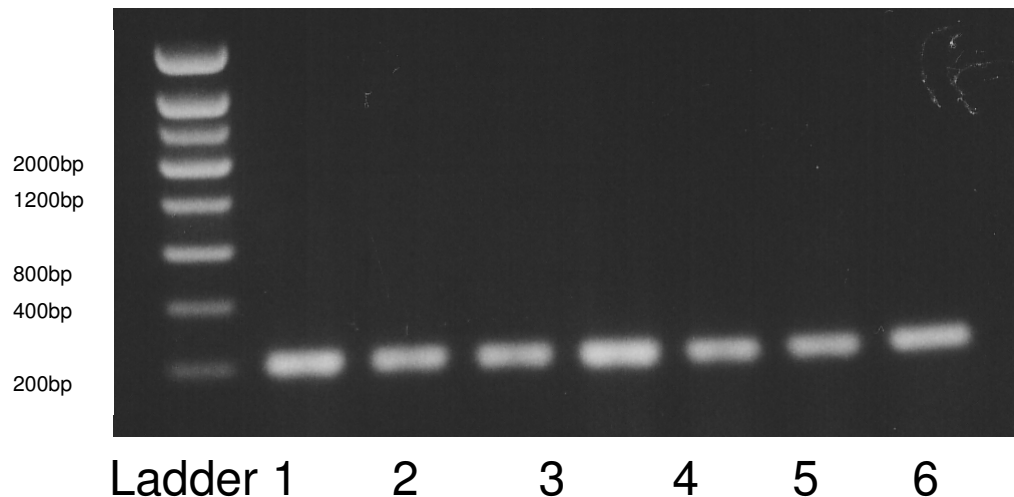


Abbildung 44: RT-PCR-Ergebnisse EGFR

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der RT-PCR Untersuchung für die Expression des EGFR. Zur Identifizierung der Anzahl der Basenpaare wurde der Smart-Ladder benutzt. 1.) Behandlung mit RPMI-Medium, 2.) Behandlung mit RPMI-Medium, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF, 3.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium, 4.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium, anschließende fünfminütige Stimulation mit EGF, 5.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium mit zweifacher IC_{50} Gefitinib, 6.) Behandlung mit RPMI-Hungermedium mit zweifacher IC_{50} Gefitinib und anschließender fünfminütiger Stimulation mit EGF

Die untersuchten Bedingungen zeigten keine Veränderung in der Expression der EGFR-RNA. Auch die Inkubation mit Gefitinib führte zu keiner in diesem Versuch darstellbaren Änderung der RNA Expression für den EGFR.

4 Diskussion

Kopf- und Halstumoren machen rund 5% der gesamten Tumorerkrankungen aus und haben in der Europäischen Union eine jährliche Inzidenz von 34,6/100.000 und eine jährliche Mortalität von 13,7/100 000 (58).

Die primäre Lokoregionäre Ausdehnung und die therapeutische Tumorkontrolle bestimmen die Prognose. Die Fünfjahresüberlebensrate schwankt stark in Abhängigkeit von den UICC Stadien zwischen 75-90% für Stadium I und 10-30% im Stadium IV.

Die Rolle der Chemotherapie wird bei Kopf- und Halstumoren in Abhängigkeit von der chirurgischen Resektabilität zum Teil kontrovers diskutiert. Die adjuvante Radiotherapie oder Chemotherapie auf Platinbasis hat in großen Metaanalysen in der Patientengruppe mit resektablen Karzinomen trotz guter Tumorkontrollrate keinen Überlebensvorteil gegenüber alleiniger postoperativer Radiatio gezeigt (58; 61). Die Induktionschemotherapie konnte ebenfalls keine Überlebensverlängerung, allerdings eine Reduzierung der Fernmetastasen zeigen. Einen wichtigen Stellenwert hat die Induktionschemotherapie (Cisplatin und 5-Fluorouracil) im Bezug auf die Organerhaltung insbesondere bei Hypopharynx- und Larynx-Karzinomen. Bei gutem Ansprechen ist eine anschließende alleinige Radiatio ohne chirurgische Intervention möglich. Die organerhaltende Therapie hat keinen negativen Einfluss auf das Überleben der Patienten verglichen mit der radikalen operativen Therapie (58).

Die Standardtherapie der Patienten mit nichtresektablen Karzinomen ist eine kombinierte Radiochemotherapie auf Platinbasis. Diese Therapie zeigt einen deutlichen Vorteil gegenüber alleiniger Radiatio im rezidivfreien und absoluten Überleben der Patienten, ist allerdings mit einer höheren Toxizität verbunden. In einigen Studien wird ein sequentieller Therapieansatz als bestmögliche Therapie bei fortgeschrittenen Karzinomen empfohlen. Dabei ist die Induktionstherapie mit einer Radiochemotherapie einer eventuell anschließenden chirurgischen Intervention vorgeschaltet.

Carboplatin bietet eine weniger wirksame aber auch weniger toxische Alternative zu Cisplatin in der platinbasierten Therapie. Carboplatin und Paclitaxel sind hinsichtlich der Überlappung der Toxizitätsspektren (Nephro- und Neurotoxizität) besser geeignet als die Kombination aus Cisplatin und Paclitaxel. Für einige Patientengruppen könnte dieser Vorteil gegenüber der geringeren Ansprechrate überwiegen. Außerdem kann

Paclitaxel in der Kombination mit Carboplatin in höheren Dosen verabreicht werden (19; 33).

Als palliative Chemotherapie bei Rezidivkarzinomen wird Methotrexat eingesetzt. Zwar zeigten Kombinationsschemata z.B. mit Cisplatin, 5-Fluorouracil und Taxanen höhere Ansprechraten in dieser Patientengruppe hatten aber Einfluss auf das Gesamtüberleben (58).

Die Überexpression des EGF-Rezeptors spielt eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese und ist in wichtigen Mechanismen des Tumorwachstums involviert wie Zellproliferation, Motilität, Zelladhäsion, Invasion und Angiogenese (2; 7; 32; 47). Der EGFR wird in einer Vielzahl von soliden Tumoren unter anderem in nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, Mammakarzinomen, Magenkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Pankreaskarzinomen, Prostatakarzinomen, Ovarialkarzinomen und Tumoren des Kopf- und Halsbereiches überexprimiert (3; 59). Die Überexpression des EGFR als prognostischer Faktor für das Ansprechen auf eine *EGFR-targeted-Therapy* und auf das Überleben wird kontrovers diskutiert. Nicolson et al. zeigten in einer Übersichtsarbeit, dass in 70% von über 200 Studien die Überexpression des EGFR ein starker prognostischer Faktor hinsichtlich des verkürzten rezidivfreien Überlebens und Gesamtüberlebens von Patienten mit verschiedenen Karzinomen darstellt (50). Allerdings gibt es verschiedene Patientengruppen für die dieser Zusammenhang nicht gilt (80).

Für Kopf- und Halskarzinome zeigte Grandis et al., dass der EGFR und seine Liganden (z.B. TNF- α) als starke prognostischen Faktoren für Patienten mit Kopf- und Halstumoren zu werten sind (3; 24; 43; 59; 62; 65).

Die Familie der transmembranen ErbB-Rezeptoren und ihrer Signalkaskade eignet sich daher als Ziel für eine Antitumorthherapie. Der monoklonale chimäre Antikörper gegen die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle des EGFR, Cetuximab, wurde für die Therapie von Kolonkarzinomen (in Kombinationstherapie mit Irinotecan bei Irinotecan-refraktären-Karzinomen) zugelassen. Die beiden Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Erlotinib werden für die Behandlung von Patienten mit nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen bzw. für das Pankreaskarzinom (Erlotinib) eingesetzt. Andere Substanzen dieser Gruppen wie Matuzumab (EMD 72000), ABX-EGF und Erlotinib werden in Phase-II-Studien untersucht (7).

Andere Möglichkeiten die Wirkung des EGFR zu inhibieren sind Immunkomplekonjugate (zytotoxische Substanzen gekoppelt an anti-EGFR-

Antikörper) oder Antisense-Nucleotide gegen EGFR- oder TGF- α -mRNA (27). Neue Wege die in die Signaltransduktionskette des EGFR einzugreifen werden ebenfalls derzeit klinisch geprüft.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib auf die Plattenepithelkarzinomzelllinie A253 alleine und in Kombination mit Alkylanzien (Cisplatin, Carboplatin), tubulusinteraktiven Substanzen (Paclitaxel), DNA-Topoisomerase-I-Inhibitoren (Irinotecan) und Antimetabolite (5-Fluorouracil) mittels Zytotoxizitätstests, Westernblot und RT-PCR-Analysen untersucht. Für die in vitro Experimente konnte mittels der Wachstumskinetik ein exponentielles Wachstum über die Inkubationszeitraum nachgewiesen werden. Sowohl bei der Wachstumskinetik als auch bei den Zytotoxizitäts- und Interaktionsversuchen wurde der SRB-Assay eingesetzt.

Der proteingebundene SRB-Assay basiert auf dem Prinzip, dass durch Zytostatika abgetötete Zellen lysieren und bei den Spülgängen ausgewaschen werden. Anfärbbar bleibt damit nur der zelluläre Proteinkomplex. Problematisch sind hierbei avitale nicht lysierte Zellen, die zur artifiziellen Erhöhung der gemessenen Absorptionswerte führen können (66). Die im SRB-Assay gemessene optische Dichte wird weiterhin durch die Einwirkzeit der Trichloressigsäure beeinflusst. Bei einer 24-stündigen Inkubationsdauer verdoppelt sich die optische Dichte, was auf eine vermehrte Ausfällung von Mediumproteinen zurückzuführen ist. Aus dem gleichen Grund erhöhen sich die Absorptionswerte mit steigendem Gehalt des Mediums an fetalem Kälberserum (70). In den durchgeführten Versuchen betrug die Fixationsdauer maximal zwei Stunden, sodass die Beeinflussung der optischen Dichte durch Fällung von Mediumproteinen vernachlässigbar war. Die Mediumkonzentration an fetalem Kälberserum war mit 10% (v/v) während aller Versuche identisch.

Die für die Versuche eingesetzten Zytostatika (Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Paclitaxel) sind in der Behandlung von Kopf- und Halstumoren etabliert.

Für die Bestimmung der EGFR-Expression in Tumorgewebe gibt es bisher kein einheitliches Verfahren. In der Literatur gibt es daher große Schwankungen in den EGFR-Expressionsraten verschiedener Tumorentitäten (7). Immunhistochemie (IHC) ist eine geeignete Methode zum EGFR-Nachweis auf zellulärer Ebene und ist für die

Bestimmung der EGFR-Expression in Tumorproben von Patienten klinisch etabliert. Derzeit werden verschiedene Antikörper für die IHC benutzt (3). Mit spezifischen anti-EGFR-Antikörpern ist auch die Bestimmung der phosphorylierten Form des EGFR möglich.

Im Westernblot werden die Rezeptorproteinkonzentrationen unabhängig von der Rezeptorlokalisierung und zellulärer Heterogenität nachgewiesen.

Auch geringe Mengen des EGFR-RNA-Transkriptes können mit Hilfe der RT-PCR gemessen werden. Allerdings korreliert das detektierte RNA-Transkript nicht unbedingt mit der Höhe des exprimierten Rezeptormoleküls, noch wird der Funktionalität nachgegangen (Homo-Heterodimerbildung). Für die IHC können auch in Paraffin eingebettete Tumorbiopsate verwendet werden, während für die RT-PCR (bedingt) und die Westernblotuntersuchungen frische Proben vorhanden sein müssen. In dieser Arbeit wurden RT-PCR und Westernblotuntersuchungen verwendet um die EGFR-Expression zu quantifizieren.

Bei den Versuchen zur Zytotoxizität der Monosubstanzen wurde die Zelllinie A253 24h mit den verschiedenen Zytostatika inkubiert. Um eine 50% Wachstumshemmung der Zelllinie zu erreichen wurden je nach Substanz Konzentrationen zwischen $10^{-3}\mu\text{mol/l}$ bis $28\mu\text{mol/l}$ benötigt. Als sehr zytotoxisch erwiesen sich die tubulusinteraktive Substanz Paclitaxel und der DNA-Topoisomerase-I-Inhibitor Irinotecan mit einer IC_{50} in nanomolaren Konzentrationen. Die beiden Platinderivate Cisplatin und Carboplatin benötigten dagegen Konzentrationen im mikromolaren Bereich, um eine 50%ige Wachstumshemmung zu erreichen. Die IC_{50} von Carboplatin lag dabei wie auch in der Literatur beschrieben um den Faktor 20 höher als für Cisplatin (31). Gefitinib wurde als einzige Substanz mit zwei verschiedenen Inkubationszeiten untersucht. Längere Inkubationszeiten führten dabei zu einer deutlich höheren Toxizität von Gefitinib (14-fach). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Gefitinib eine höhere Affinität für den EGF-Rezeptor als ATP aufweist. Mit längerer Inkubationszeit steigt somit die Bindung an den EGFR, da Gefitinib kompetitiv mit ATP um die Bindungsstelle konkurriert ($K_a/K_i=390$).

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Zytotoxizitäten der Platinderivate, Taxane und Topoisomerase-I-Inhibitoren leitet sich aus der hohen Proliferationsrate der A253 ab.

Sie greifen zu unterschiedlichen Zeiten des Zellzyklus in der Proliferationsphase ein. Alkylanzien wie Cisplatin und Carboplatin wirken bei proliferierenden Zellen in allen Stadien des Zellzyklus. Die Sensibilität eines Karzinoms auf ein Chemotherapeutikum hängt von der Zellzyklusphase ab, in der sich die meisten Zellen des Tumors befinden. Mitosehemmstoffe wie Paclitaxel greifen in der G₂/M-Phase ein und führen zu einem G₂ Arrest. In der S-Phase des Zellzyklus führt Irinotecans aktiver Metabolit SN38 zu stabilen Topo-I-DNA-Komplexen, die bei fortschreitender Replikationsgabel zu letalen Strangbrüchen der Erbsubstanz führen. 5-Fluorouracil wirkt als Antimetabolit in der G₁ und S-Phase des Zellzyklus. Gefitinib inhibiert die Tyrosinkinase des EGFR. Megane et al. zeigten, dass es nach einer 24-stündigen Inkubation mit Gefitinib zu einer Akkumulation der Zellen in der G₀/G₁-Phase kommt, weniger Zellen zeigten den Status der S-Phase. Barnes et al. zeigten, dass Gefitinib in Zelllinien mit einer erhöhten Aktivität der EGFR vermittelten *Downstreampathways* die Proteinkinase MAPK und Pak1 inhibiert und damit das Zellüberleben und die Motilität der Tumorzellen blockiert (5).

Mit der Einführung neuer zytotoxischer Substanzen liegt die mediane Überlebenszeit für Patienten mit nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen bei 11 Monaten.

Die beiden Phase-II Studien IDEAL1 (Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer) und IDEAL2 sollten die Effektivität von Gefitinib in der Therapie von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen herausarbeiten. Eingeschlossen wurden in IDEAL1 Patienten mit ≤ 2 Vortherapien, in IDEAL2 ≥ 2 Vortherapien (74). Gefitinib zeigte in diesen Studien eine vielversprechende Antitumoraktivität mit einer Verbesserung des Gesamtüberlebens von 2 (supportive Therapie) auf 6-8 Monate unter Gefitinib-Monotherapie.

Daraufhin wurden die beiden großen Phase-III Studien INTAKT 1 und 2 (Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Treatment) durchgeführt, in denen man nicht vorbehandelte Patienten mit fortgeschrittenen NSCLC mit der Kombination von Gefitinib (250/500mg) mit etablierten Chemotherapieschemata untersuchte (Gemcitabine/Cisplatin oder Paclitaxel/Carboplatin mit jeweils +250/500mg Gefitinib oder Plazebo). Gefitinib zeigte in INTAKT1 und INTAKT2 keine Verlängerung der medianen Überlebenszeit. Eine mögliche Erklärung des negativen Ausgangs der beiden Studien könnte die zytostatische Wirkung von Gefitinib sein (in INTAKT 1 und 2 wurde Cisplatin/Gemcitabine bzw. Carboplatin/Paclitaxel und Gefitinib simultan

verabreicht) (29;56;17). Obwohl präklinische Studien einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Dosissteigerung von Gefitinib und höherer Antitumoraktivität gezeigt haben, wurde in Phase-I-Studien gezeigt, dass die Erhöhung der Dosis keinen größeren klinischen Benefit bringt. Dosierungen zwischen 250mg und 700mg Gefitinib erzielten gleiche antitumorale Wirkung aber mit einer verstärkten Ausprägung von Gefitinib assoziierten Nebenwirkungen der höheren Dosierung. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Konzentration im Gewebe nicht im zytotoxischen Bereich liegen muss, um eine antitumorale Wirkung zu entwickeln. Die Ergebnisse der in vitro Interaktionsversuche dieser Arbeit zeigen allerdings keine synergetischen antitumorale Effekte zwischen Gefitinib in subtoxischer Dosierung und den untersuchten Zytostatika. In der Literatur sind Interaktionen zwischen den in dieser Arbeit untersuchten zytotoxischen Substanzen Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Paclitaxel mit Gefitinib beschrieben. Magané et al. zeigten zum Beispiel 2003 in präklinischen Versuchen an der Kopf- und Halstumorzelle CAL33 einen Synergismus zwischen Gefitinib und Cisplatin/5-Fluorouracil. Die Expositionsdauer der zytotoxischen Substanzen betrug 48h für Gefitinib allein und weitere 48h für die Exposition mit der Kombination von Gefitinib mit Cisplatin und 5-Fluorouracil und ist somit wesentlich länger als die in dieser Arbeit verwendete Expositionsdauer. Magané fand heraus, dass in den Experimenten mit der Zelllinie CAL33 die Applikationsreihenfolge der zytotoxischen Substanzen einen Einfluss auf den synergetischen antitumorale Effekt hat. Die höchste zytotoxische Wirkung wurde für die Sequenz Gefitinib gefolgt von Cisplatin und 5-Fluorouracil erzielt (42). Weiterhin untersuchte die Gruppe die Kombination der oral verfügbaren Form von 5-Fluorouracil „Capecitabin“ und Gefitinib ebenfalls an der Zelllinie CAL33. Auch hier wurde ein zytotoxischer Synergismus gefunden (41). Auf der anderen Seite zeigte Magné et al. 2002, dass Gefitinib im Anschluss an die Chemotherapie appliziert antagonistische zytotoxische Synergismen zeigt (52). Azzarti et al. zeigt 2004 im Gegensatz dazu an den beiden Kolonkarzinomzellen HT-29 und LoVo, dass die Reihenfolge der Applikation, nämlich SN38 vor Gefitinib, bei ihren Versuchen entscheidend für den Synergismus der beiden Substanzen war (4). Park et al. zeigte 2004 präklinisch für die Zelllinie SNU-1 (humane Magenkarzinomzelle), dass eine Kombination von Gefitinib und Paclitaxel synergistische Interaktionen zeigt (55).

Da bisher nur eine Subgruppe von Patienten auf eine anti-ErbB1 Therapie anspricht ist eine weitere molekulare Identifizierung der selektiven Tumoren nötig (36; 52). Im Gegensatz zu Trastuzumab (Herceptin), einem Antikörper gegen Her2/neu (ErbB2), zugelassen zur Therapie von Her2/neu-positiven Mammakarzinomen, lässt sich bei der *EGFR-targeted-therapy* kein Zusammenhang zwischen Expressionslevel von EGFR und Ansprechrate feststellen (3; 10). Capuzzo et al. postulieren, dass im Bezug auf ihre Studie (2005) eine hohe HER2-Gen-Kopienzahl in Biopsien auf eine Sensitivität gegenüber Gefitinib von Patientinnen und Patienten mit EGFR-positiven, nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen schließen lässt (12).

Eventuell ist die Ansprechrate bei der EGFR-Therapie in direktem Bezug zur Abhängigkeit des individuellen Tumors von der EGFR-Signalkaskade zu sehen. Eine Resistenz gegenüber der EGFR-Inhibition durch Aktivierung der Signalkaskade über andere Tyrosinkinaserzeptor-assoziierte Signalwege wie z.B. den IGF-1R wäre eine mögliche Erklärung. Die PI-3K/AKT-Signalkaskade ist sowohl eine Signalkaskade des EGFR als auch ein wichtiger *Downstream-Mechanismus* des IGF-1R. Chakravarti et al. zeigten an Glioblastomzellen mit hohem Expressionslevel von EGFR eine geringere Ansprechrate auf eine EGFR-targeted-Therapie die mit einem Ansteigen der IGF-R1-Expression unter Gefitinib-Therapie assoziiert war. Das macht einen *Bypass-Mechanismus* zu einer wahrscheinlichen Möglichkeit der Resistenzbildung (10). Auch eine eigenständige Aktivierung der Signalkaskaden durch Mutationen der Schlüsselenzyme des Rezeptors ist durch verschiedene Studien denkbar geworden (AKT-Signalkaskade, Raf/MPK-Signalkaskade, STAT-3 Signalkaskade) (10). Möglichkeiten medikamentös auf dieser Stufe der Signaltransduktion einzugreifen, werden im Bereich der Kopf- und Halstumoren derzeit geprüft. So wird z.B. ein Inhibitor der c-Raf (BAY 43-9006) in einer klinischen Studie untersucht. Auch die STAT3 wird zum Ziel neuer Therapieansätze. STAT3 wird durch die Bindung von TGF α an den EGFR über die Src-Kinase und die Janus-Kinase (JAK) aktiviert. Präklinisch ist es möglich, über eine Antisense-Therapie das Wachstum von Kopf- und Halstumoren zu hemmen. Andere Ansätze greifen direkt an das STAT3-Protein oder JAK bzw. Src an (14). Eine ligandenunabhängige Aktivierung der Signalkaskade über den Integrin-*Bypass* stellt ebenfalls einen möglichen Resistenzmechanismus gegenüber einer anti-EGFR Therapie da.

Mutationen des EGFR können den Therapieerfolg der EGFR-Therapie in beide Richtungen beeinflussen. Bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen ist die EGFRvIII-Mutante mit einer besseren Ansprechrate der Gefitinibtherapie vergesellschaftet. Diese EGFR-Mutante ist häufiger bei Frauen und bei japanischen Patienten. Diese Subgruppen werden auch mit einem besseren Ansprechen in der INTAKT-Studie in Verbindung gebracht. Tumore mit Mutationen im EGFR könnten in ihrer Zellproliferation stärker von dem Einfluss des Rezeptor abhängig sein und daher besser auf Gefitinib ansprechen (10).

Die Ergebnisse dieser Arbeit, d.h. keine synergistischen zytotoxischen Interaktionen mit Gefitinib, stimmen mit der klinischen INTAKT-Studie überein und könnten durch die o. a. verschiedenen zellulären Mechanismen erklärt werden.

Es gibt in der Literatur Hinweise, dass Gefitinib in geringen Konzentrationen bleibenden Einfluss auf das Zellwachstum hat. Satoh H. et al. stellten 2004 in einem Experiment mit 4 Zelllinien vom Typ des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom fest, dass nach Absetzen einer 24stündigen Behandlung mit Gefitinib in einer Konzentration kleiner als 1µM die Wachstumsrate der Zellen prolongiert gehemmt war (68).

In den Westernblotuntersuchungen dieser Arbeit wurde die äquivalenten Proteinladungen der Proben durch gleichstarke Banden von β -Aktin bestätigt. Durch spezifische Antikörper gegen den EGF-Rezeptor konnte die EGFR-Proteinexpression in der Zelllinie A253 nachgewiesen werden. Die Stimulation mit EGF verursachte keinen quantitativen *Shift* des EGFR. Vergleicht man allerdings die Proteinbanden der unbehandelten A253-Zellen mit denen, die vor der Isolation der Proteinextrakte 5min mit EGF stimuliert wurden, fällt ein quantitativer *Shift* auf, der durch Zugabe von Gefitinib unterdrückt werden konnte. Trotz Verwendung verschiedener Trenngele konnte mittels SDS-Gelelektrophorese keine weitere Auftrennung dieser EGFR-Bande erreicht werden.

Eine der typischen Reaktionen der Zellen auf Stressbedingungen wie Nährstoffmangelbedingungen ist der G1-Arrest. In den Versuchen setzten wir die Zelllinie A253 Nährstoffmangelbedingungen (keine Serumzusätze) aus, um den Einfluss dieser Milieu-Bedingungen auf die Protein- und RNA-Expression des EGFR zu untersuchen.

EGFR und die anderen Rezeptoren der ErbB-Familie führen in Karzinomzellen unter anderem zu einer Hemmung der Apoptose. Die Ergebnisse der Westernblot und RT-PCR-Versuche konnten keine Veränderung der EGFR-Proteinexpression bzw. der RNA-Expression der Zellen feststellen, die unter Nährstoffmangel inkubiert wurden. Selbst die Stimulation mit EGF veränderte die RNA-Expression der Zelllinie nicht. Egeblad et al. zeigten bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit hoher EGF-Rezeptordichte, dass die EGFR-Expression und die Stimulation mit EGF die Zellen nicht vor der Apoptose durch Stressbedingungen wie Nährstoffmangelbedingungen oder TNF α -Exposition schützt (21).

Die Stimulation von A253-Zellen mit EGF zeigt unter den Versuchsbedingungen im Westernblot, dass es schon nach einer 5minütigen Stimulation Veränderungen im EGF-Rezeptor gibt, die mit Gefitinib zu blockieren sind. Diese Veränderungen sind auf Proteinebene, waren allerdings nicht mit einer Alteration der EGFR mRNA assoziiert

Insgesamt ist bisher das Wirkungsnetz der ErbB-Familie nicht vollständig verstanden. In der Literatur sind sich die Autoren nur darüber einig, dass es weiterer präklinischer und klinischer Forschung unter vergleichbaren Bedingungen bedarf, um sowohl Therapieschemata als auch Patientensubgruppen besser zu identifizieren, die von einer klinischen EGFR-Blockade profitieren.

5 Zusammenfassung

Die systemische Chemotherapie hat in der Behandlung der Kopf- und Halstumoren eine zunehmende Bedeutung und wird neben oder in Kombination mit der chirurgischen Therapie und/oder der Radiotherapie klinisch eingesetzt. Die Signaltransduktion der Familie der humanen epidermalen Wachstumsfaktoren ErbB1 (EGFR), ErbB2, ErbB3 und ErbB4 konnte als neuer Ansatz der antitumoralen Therapie bei Kopf- und Halstumoren definiert werden. EGFR ist ein transmembranes Glykoprotein mit einer extrazellulären Bindungsstelle und einer intrazellulären Tyrosinkinasefunktion und ist in ca. 90% der Tumoren des Kopf- und Halsbereiches exprimiert. Die EGFR-Expression ist mit einer erhöhten Proliferationsrate, gesteigerter Angiogenese, Invasivität und verminderter Apoptose der Tumorzelle korreliert und geht mit einer schlechteren Prognose der Erkrankungen einher. Eine Blockade der EGFR-assoziierten Signaltransduktion kann an der ATP-Bindungsstelle der EGFR-Tyrosinkinase mit Gefitinib erfolgen. Gefitinib wird in der Therapie der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome klinisch eingesetzt und ist im Bereich der Kopf- und Halstumoren im klinisch experimentellen Stadium. In experimentellen Untersuchungen wurde der Einfluss von Gefitinib in subtoxischen Konzentrationen in Kombination mit den zytotoxischen Substanzen Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Paclitaxel an der Kopf- und Halstumorzelllinie A253 untersucht. Mittels Westernblot- und RT-PCR-Analysen wurde der Einfluss von Gefitinib mit und ohne Stimulation mit einem Liganden „*epithelial growth factor*„ (EGF) auf die Expression des EGFR unter Nährstoffmangelbedingungen untersucht. Gefitinib zeigte als Monosubstanz zytotoxische Wirkung auf die Zelllinie A253. Die Kombination von Gefitinib in subtoxischer Konzentration mit den o. a. zytotoxischen Substanzen zeigte keinen zytotoxischen Synergismus. In den RT-PCR-Analysen konnte kein Effekt von Gefitinib oder der Stimulation mit EGF auf Zellen unter Nährstoffmangelbedingungen nachgewiesen werden. Im Westernblot zeigte sich unter optimalen und unter Nährstoffmangelbedingungen ein qualitativer „*Shift*“ in der EGFR-Proteinbande, der mit Gefitinib zu inhibieren war. In der quantitativen Proteinexpression konnte kein Unterschied festgestellt werden. Diese präklinischen in vitro Daten stehen im Einklang mit den klinischen Daten einer Kombinationstherapie von Gefitinib mit platinbasierter Chemotherapie an Patienten mit nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen und legen nahe, dass der Einsatz von Gefitinib nicht zu einer erhöhten antitumoralen Wirkung dieser Zytostatika führt.

6 Literaturverzeichnis

1. Akita, R. W., and Sliwkowski, M. X. (2003):
Preclinical Studies with Erlotinib (Tarceva).
Rev. of Semin Oncol 30.3 Suppl 7: 15-24.
2. Albanell, J., Codony-Servat, J., Rojo, F., Del Campo, J. M., Sauleda, S., Anido, J., Raspall, G., Giralt, J., Rosello, J., Nicholson, R. I., Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2001):
Activated Extracellular Signal-Regulated Kinases: Association with Epidermal Growth Factor Receptor/Transforming Growth Factor Alpha Expression in Head and Neck Squamous Carcinoma and Inhibition by Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Treatments.
Rev. of Cancer Res 61.17: 6500-10.
3. Arteaga, C. L. (2002):
Epidermal Growth Factor Receptor Dependence in Human Tumors: More Than Just Expression?
Rev. of Oncologist 7 Suppl 4: 31-9.
4. Azzariti, A., Xu, J. M., Porcelli, L., and Paradiso, A. (2004):
The Schedule-Dependent Enhanced Cytotoxic Activity of 7-Ethyl-10-Hydroxy-Camptothecin (Sn-38) in Combination with Gefitinib (Iressa, Zd1839).
Rev. of Biochem Pharmacol 68.1: 135-44.
5. Barnes, C. J., Bagheri-Yarmand, R., Mandal, M., Yang, Z., Clayman, G. L., Hong, W. K., and Kumar, R. (2003):
Suppression of Epidermal Growth Factor Receptor, Mitogen-Activated Protein Kinase, and Pak1 Pathways and Invasiveness of Human Cutaneous Squamous Cancer Cells by the Tyrosine Kinase Inhibitor Zd1839 (Iressa).
Rev. of Mol Cancer Ther 2.4: 345-51.

6. Baselga, J. (2002):
Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor with Tyrosine Kinase Inhibitors: Small Molecules, Big Hopes.
Rev. of J Clin Oncol 20.9: 2217-9.
7. Baselga, J., and Arteaga, C. L. (2005):
Critical Update and Emerging Trends in Epidermal Growth Factor Receptor Targeting in Cancer.
Rev. of J Clin Oncol 23.11: 2445-59.
8. Brabender, J., Danenberg, K. D., Metzger, R., Schneider, P. M., Park, J., Salonga, D., Holscher, A. H., and Danenberg, P. V. (2001):
Epidermal Growth Factor Receptor and Her2-Neu Mrna Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Is Correlated with Survival.
Rev. of Clin Cancer Res 7.7: 1850-5.
9. Burtneess, B. (2005):
Cetuximab and Cisplatin for Chemotherapy-Refractory Squamous Cell Cancer of the Head and Neck.
Rev. of J Clin Oncol 23.24: 5440-2.
10. Camp, E. R., Summy, J., Bauer, T. W., Liu, W., Gallick, G. E., and Ellis, L. M. (2005):
Molecular Mechanisms of Resistance to Therapies Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor.
Rev. of Clin Cancer Res 11.1: 397-405.
11. Caponigro, F., Ionna, F., and Comella, G. (2004):
New Cytotoxic and Molecular-Targeted Therapies of Head and Neck Tumors.
Rev. of Curr Opin Oncol 16.3: 225-30.

12. Cappuzzo, F., Varella-Garcia, M., Shigematsu, H., Domenichini, I., Bartolini, S., Ceresoli, G. L., Rossi, E., Ludovini, V., Gregorc, V., Toschi, L., Franklin, W. A., Crino, L., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Jr., and Hirsch, F. R. (2005):
Increased Her2 Gene Copy Number Is Associated with Response to Gefitinib Therapy in Epidermal Growth Factor Receptor-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer Patients.
Rev. of J Clin Oncol 23.22: 5007-18.
13. Clavel, M., Vermorken, J. B., Cognetti, F., Cappelaere, P., de Mulder, P. H., Schornagel, J. H., Tueni, E. A., Verweij, J., Wildiers, J., Clerico, M., and et al. (1994):
Randomized Comparison of Cisplatin, Methotrexate, Bleomycin and Vincristine (Cabo) Versus Cisplatin and 5-Fluorouracil (Cf) Versus Cisplatin (C) in Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. A Phase Iii Study of the Eortc Head and Neck Cancer Cooperative Group.
Rev. of Ann Oncol 5.6: 521-6.
14. Cohen, E. E. (2004):
Novel Therapeutic Targets in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.
Rev. of Semin Oncol 31.6: 755-68.
15. Cohen, E. E., Rosen, F., Stadler, W. M., Recant, W., Stenson, K., Huo, D., and Vokes, E. E. (2003):
Phase Ii Trial of Zd1839 in Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.
Rev. of J Clin Oncol 21.10: 1980-7.
16. Damstrup, L., Kuwada, S. K., Dempsey, P. J., Brown, C. L., Hawkey, C. J., Poulsen, H. S., Wiley, H. S., and Coffey, R. J., Jr. (1999):
Amphiregulin Acts as an Autocrine Growth Factor in Two Human Polarizing Colon Cancer Lines That Exhibit Domain Selective Egf Receptor Mitogenesis.
Rev. of Br J Cancer 80.7: 1012-9.

17. Dancey, J. E., and Freidlin, B. (2003):
Targeting Epidermal Growth Factor Receptor--Are We Missing the Mark?
Rev. of Lancet 362.9377: 62-4.
18. Decker, J., and Goldstein, J. C. (1982):
Risk Factors in Head and Neck Cancer.
Rev. of N Engl J Med 306.19: 1151-5.
19. Dunphy, F. R., Dunleavy, T. L., Harrison, B. R., Trinkaus, K. M., Kim, H. J.,
Stack, B. C., Jr., Needles, B., and Boyd, J. H. (2001):
Induction Paclitaxel and Carboplatin for Patients with Head and Neck
Carcinoma. Analysis of 62 Patients Treated between 1994 an 1999.
Rev. of Cancer 91.5: 940-8.
20. Durban, E., Goodenough, M., Mills, J., and Busch, H. (1985):
Topoisomerase I Phosphorylation in vitro and in Rapidly Growing Novikoff
Hepatoma Cells.
Rev. of Embo J 4.11: 2921-6.
21. Egeblad, M., and Jaattela, M. (2000):
Cell Death Induced by Tnf or Serum Starvation Is Independent of Erbb
Receptor Signaling in Mcf-7 Breast Carcinoma Cells.
Rev. of Int J Cancer 86.5: 617-25.
22. Ellis, E. R., Mendenhall, W. M., Rao, P. V., Parsons, J. T., Spangler, A. E., and
Million, R. R. (1989):
Does Node Location Affect the Incidence of Distant Metastases in Head and
Neck Squamous Cell Carcinoma?
Rev. of Int J Radiat Oncol Biol Phys 17.2: 293-7.
23. El-Sayed, S., and Nelson, N. (1996):
Adjuvant and Adjunctive Chemotherapy in the Management of Squamous Cell
Carcinoma of the Head and Neck Region. A Meta-Analysis of Prospective and
Randomized Trials.
Rev. of J Clin Oncol 14.3: 838-47.

24. Etienne, M. C., Pivot, X., Formento, J. L., Bensadoun, R. J., Formento, P., Dassonville, O., Francoual, M., Poissonnet, G., Fontana, X., Schneider, M., Demard, F., and Milano, G. (1999):
A Multifactorial Approach Including Tumoural Epidermal Growth Factor Receptor, P53, Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase to Predict Treatment Outcome in Head and Neck Cancer Patients Receiving 5-Fluorouracil.
Rev. of Br J Cancer 79.11-12: 1864-9.
25. Faivre, S., Marti, A., Rixe, O., Janot, F., Julieron, M., Gattineau, M., Temam, S., Armand, J. P., Domenge, C., Lubinski, B., and Raymond, E. (2005):
Preoperative Sequential Chemotherapy in Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.
Rev. of Head Neck 27.4: 311-9.
26. Favoni, R. E., and de Cupis, A. (2000):
The Role of Polypeptide Growth Factors in Human Carcinomas: New Targets for a Novel Pharmacological Approach.
Rev. of Pharmacol Rev 52.2: 179-206.
27. Ford, A. C., and Grandis, J. R. (2003):
Targeting Epidermal Growth Factor Receptor in Head and Neck Cancer.
Rev. of Head Neck 25.1: 67-73.
28. Garcia-Carbonero, R., and Supko, J. G. (2002):
Current Perspectives on the Clinical Experience, Pharmacology, and Continued Development of the Camptothecins.
Rev. of Clin Cancer Res 8.3: 641-61.
29. Giaccone, G. (2004):
The Role of Gefitinib in Lung Cancer Treatment.
Rev. of Clin Cancer Res 10.12 Pt 2: 4233s-37s.

30. Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., and Parks, W. P. (1973):
In vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived from a Series of Solid Tumors.
Rev. of J Natl Cancer Inst 51.5: 1417-23.
31. Go, R. S., and Adjei, A. A. (1999):
Review of the Comparative Pharmacology and Clinical Activity of Cisplatin and Carboplatin.
Rev. of J Clin Oncol 17.1: 409-22.
32. Grunwald, V., and Hidalgo, M. (2003):
Developing Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor for Cancer Treatment.
Rev. of J Natl Cancer Inst 95.12: 851-67.
33. Haddad, R., Tishler, R. B., Norris, C. M., Mahadevan, A., Busse, P., Wirth, L., Goguen, L. A., Sullivan, C. A., Costello, R., Case, M. A., and Posner, M. R. (2003):
Docetaxel, Cisplatin, 5-Fluorouracil (Tpf)-Based Induction Chemotherapy for Head and Neck Cancer and the Case for Sequential, Combined-Modality Treatment.
Rev. of Oncologist 8.1: 35-44.
34. Harari, P. M. (2004):
Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition Strategies in Oncology.
Rev. of Endocr Relat Cancer 11.4: 689-708.
35. Harding, J., and Burtneess, B. (2005):
Cetuximab: An Epidermal Growth Factor Receptor Chemeric Human-Murine Monoclonal Antibody.
Rev. of Drugs Today (Barc) 41.2: 107-27.

36. Herbst, R. S. (2005):
Role of Novel Targeted Therapies in the Clinic.
Rev. of Br J Cancer 92 Suppl 1: S21-7.
37. Herbst, R. S., and Hong, W. K. (2002):
Imc-C225, an Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody for
Treatment of Head and Neck Cancer.
Rev. of Semin Oncol 29.5 Suppl 14: 18-30.
38. Kotwall, C., Sako, K., Razack, M. S., Rao, U., Bakamjian, V., and Shedd, D. P.
(1987):
Metastatic Patterns in Squamous Cell Cancer of the Head and Neck.
Rev. of Am J Surg 154.4: 439-42.
39. Leemans, C. R., Tiwari, R., Nauta, J. J., van der Waal, I., and Snow, G. B.
(1993):
Regional Lymph Node Involvement and Its Significance in the Development of
Distant Metastases in Head and Neck Carcinoma.
Rev. of Cancer 71.2: 452-6.
40. Liebowitz, D. (1994):
Nasopharyngeal Carcinoma: The Epstein-Barr Virus Association.
Rev. of Semin Oncol 21.3: 376-81.
41. Magne, N., Fischel, J. L., Dubreuil, A., Formento, P., Ciccolini, J., Formento, J.
L., Tiffon, C., Renee, N., Marchetti, S., Etienne, M. C., and Milano, G. (2003):
Zd1839 (Iressa) Modifies the Activity of Key Enzymes Linked to
Fluoropyrimidine Activity: Rational Basis for a New Combination Therapy with
Capecitabine.
Rev. of Clin Cancer Res 9.13: 4735-42.

42. Magne, N., Fischel, J. L., Tiffon, C., Formento, P., Dubreuil, A., Renee, N., Formento, J. L., Francoual, M., Ciccolini, J., Etienne, M. C., and Milano, G. (2003):
Molecular Mechanisms Underlying the Interaction between Zoladex ('Iressa') and Cisplatin/5-Fluorouracil.
Rev. of Br J Cancer 89.3: 585-92.
43. Mendelsohn, J. (2001):
The Epidermal Growth Factor Receptor as a Target for Cancer Therapy.
Rev. of Endocr Relat Cancer 8.1: 3-9.
44. Merino, O. R., Lindberg, R. D., and Fletcher, G. H. (1977):
An Analysis of Distant Metastases from Squamous Cell Carcinoma of the Upper Respiratory and Digestive Tracts.
Rev. of Cancer 40.1: 145-51.
45. Milas, L., Mason, K. A., Liao, Z., and Ang, K. K. (2003):
Chemoradiotherapy: Emerging Treatment Improvement Strategies.
Rev. of Head Neck 25.2: 152-67.
46. Moasser, M. M., Basso, A., Averbuch, S. D., and Rosen, N. (2001):
The Tyrosine Kinase Inhibitor Zoladex ("Iressa") Inhibits Her2-Driven Signaling and Suppresses the Growth of Her2-Overexpressing Tumor Cells.
Rev. of Cancer Res 61.19: 7184-8.
47. Modjtahedi, H., Eccles, S., Sandle, J., Box, G., Titley, J., and Dean, C. (1994):
Differentiation or Immune Destruction: Two Pathways for Therapy of Squamous Cell Carcinomas with Antibodies to the Epidermal Growth Factor Receptor.
Rev. of Cancer Res 54.7: 1695-701.
48. Munro, A. J. (1995):
An Overview of Randomised Controlled Trials of Adjuvant Chemotherapy in Head and Neck Cancer.
Rev. of Br J Cancer 71.1: 83-91.

49. Nevena Damjanov, M. (2004):
Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors For the Treatment of Colorectal Cancer: A Promise Fulfilled?
Rev. of Oncologie 18.4: 479-88.
50. Nicholson, R. I., Gee, J. M., and Harper, M. E. (2001):
Egfr and Cancer Prognosis.
Rev. of Eur J Cancer 37 Suppl 4: S9-15.
51. Ning, J. P., Yu, M. C., Wang, Q. S., and Henderson, B. E. (1990):
Consumption of Salted Fish and Other Risk Factors for Nasopharyngeal Carcinoma (Npc) in Tianjin, a Low-Risk Region for Npc in the People's Republic of China.
Rev. of J Natl Cancer Inst 82.4: 291-6.
52. Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A., Maiello, M. R., and Salomon, D. S. (2003):
Target-Based Agents against ErbB Receptors and Their Ligands: A Novel Approach to Cancer Treatment.
Rev. of Endocr Relat Cancer 10.1: 1-21.
53. O'Brien, M., Schofield, J. B., Lorentzos, A., Moore, J., Atkinson, H., Henk, J. M., MacLennan, K. A., and Gore, M. E. (1994):
The Use of Cisplatin Plus 5-Fluorouracil Chemotherapy in an Unselected Group of Patients with Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.
Rev. of Eur J Cancer B Oral Oncol 30B.4: 265-7.
54. O'Dwyer, P. J., Stevenson, J. P., and Johnson, S. W. (2000):
Clinical Pharmacokinetics and Administration of Established Platinum Drugs.
Rev. of Drugs 59 Suppl 4: 19-27.

55. Park, J. K., Lee, S. H., Kang, J. H., Nishio, K., Saijo, N., and Kuh, H. J. (2004): Synergistic Interaction between Gefitinib (Iressa, Zd1839) and Paclitaxel against Human Gastric Carcinoma Cells.
Rev. of Anticancer Drugs 15.8: 809-18.
56. Patel, J. D., Pasche, B., and Argiris, A. (2004):
Targeting Non-Small Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Tyrosine Kinase Inhibitors: Where Do We Stand, Where Do We Go.
Rev. of Crit Rev Oncol Hematol 50.3: 175-86.
57. Pfister, D. G., Ang, K., Brockstein, B., Colevas, A. D., Ellenhorn, J., Goepfert, H., Hicks, W. L., Jr., Hong, W. K., Kies, M. S., Lydiatt, W., McCaffrey, T., Mittal, B. B., Ridge, J. A., Schuller, D. E., Shah, J. P., Spencer, S., Trotti, A., 3rd, Urba, S., Weymuller, E. A., Jr., Wheeler, R. H., 3rd, and Wolf, G. T. (2000):
Nccn Practice Guidelines for Head and Neck Cancers.
Rev. of Oncology (Williston Park) 14.11A: 163-94.
58. Pivot, X., Kataja, V. V., and Jelic, S. (2005):
Esmo Minimum Clinical Recommendations for Diagnosis, Treatment and Follow-up of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (Scchn).
Rev. of Ann Oncol 16 Suppl 1: i62-3.
59. Pomerantz, R. G., and Grandis, J. R. (2004):
The Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network in Head and Neck Carcinogenesis and Implications for Targeted Therapy.
Rev. of Semin Oncol 31.6: 734-43.
60. Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S., and Ullrich, A. (2001):
The Epidermal Growth Factor Receptor Family as a Central Element for Cellular Signal Transduction and Diversification.
Rev. of Endocr Relat Cancer 8.1: 11-31.

61. Psyrri, A., Kwong, M., DiStasio, S., Lekakis, L., Kassir, M., Sasaki, C., Wilson, L. D., Haffty, B. G., Son, Y. H., Ross, D. A., Weinberger, P. M., Chung, G. G., Zelterman, D., Burtness, B. A., and Cooper, D. L. (2004):
Cisplatin, Fluorouracil, and Leucovorin Induction Chemotherapy Followed by Concurrent Cisplatin Chemoradiotherapy for Organ Preservation and Cure in Patients with Advanced Head and Neck Cancer: Long-Term Follow-Up.
Rev. of J Clin Oncol 22.15: 3061-9.
62. Raben, D., Bianco, C., Milas, L., and Ang, K. K. (2004):
Targeted Therapies and Radiation for the Treatment of Head and Neck Cancer: Are We Making Progress?
Rev. of Semin Radiat Oncol 14.2: 139-52.
63. Ranson, M. (2002):
Zd1839 (Iressa): For More Than Just Non-Small Cell Lung Cancer.
Rev. of Oncologist 7 Suppl 4: 16-24.
64. Reisner, A. H., Nemes, P., and Bucholtz, C. (1975):
The Use of Coomassie Brilliant Blue G250 Perchloric Acid Solution for Staining in Electrophoresis and Isoelectric Focusing on Polyacrylamide Gels.
Rev. of Anal Biochem 64.2: 509-16.
65. Rubin Grandis, J., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., and Twardy, D. J. (1998):
Levels of Tgf-Alpha and Egfr Protein in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Patient Survival.
Rev. of J Natl Cancer Inst 90.11: 824-32.
66. Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A., and Boyd, M. R. (1990):
Comparison of in vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated with a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines.
Rev. of J Natl Cancer Inst 82.13: 1113-8.

67. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995):
Epidermal Growth Factor-Related Peptides and Their Receptors in Human Malignancies.
Rev. of Crit Rev Oncol Hematol 19.3: 183-232.
68. Satoh, H., Ishikawa, H., Nakayama, M., Fujiwara, M., Ohtsuka, M., and Sekizawa, K. (2004):
Cell Growth after Withdrawal of Gefitinib ("Iressa", Zd1839) in Human Lung Cancer Cells.
Rev. of Oncol Rep 12.3: 615-9.
69. Schmoll, H.-J. Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik Und Therapie. Vol. Antineoplastische Substanzen Therapiekonzepte, 2002.
70. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M. R. (1990):
New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening.
Rev. of J Natl Cancer Inst 82.13: 1107-12.
71. Spitz, M. R. (1994):
Epidemiology and Risk Factors for Head and Neck Cancer.
Rev. of Semin Oncol 21.3: 281-8.
72. Stupp, R., Weichselbaum, R. R., and Vokes, E. E. (1994):
Combined Modality Therapy of Head and Neck Cancer.
Rev. of Semin Oncol 21.3: 349-58.
73. Sturgis, E. M., Wei, Q., and Spitz, M. R. (2004):
Descriptive Epidemiology and Risk Factors for Head and Neck Cancer.
Rev. of Semin Oncol 31.6: 726-33.
74. Tamura, K., and Fukuoka, M. (2005):
Gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer.
Rev. of Expert Opin Pharmacother 6.6: 985-93.

75. Tuyns, A. J., Esteve, J., Raymond, L., Berrino, F., Benhamou, E., Blanchet, F., Boffetta, P., Crosignani, P., del Moral, A., Lehmann, W., and et al. (1988):
Cancer of the Larynx/Hypopharynx, Tobacco and Alcohol: Iarc International Case-Control Study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France).
Rev. of Int J Cancer 41.4: 483-91.

76. Vanhoefer, U. (2003):
[Novel Molecular Approaches in the Therapy of Advanced Colorectal Carcinoma].
Rev. of Onkologie 26 Suppl 7: 70-4.

77. Vanhoefer, U., Achterrath, W, Wilke,H, Seeber,S,. (2000):
Preclinical Evaluation of Irinotecan.
Rev. of Oncologie 23.Suppl. 4: 2-7.

78. Vokes, E. E., and Athanasiadis, I. (1996):
Chemotherapy of Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck: The Future Is Now.
Rev. of Ann Oncol 7.1: 15-29.

79. Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. (1997):
Epidermal Growth Factor Receptor (Egfr) and Egfr Mutations, Function and Possible Role in Clinical Trials.
Rev. of Ann Oncol 8.12: 1197-206.

80. Volm, M., Rittgen, W., and Drings, P. (1998):
Prognostic Value of Erbb-1, Vegf, Cyclin a, Fos, Jun and Myc in Patients with Squamous Cell Lung Carcinomas.
Rev. of Br J Cancer 77.4: 663-9.

81. Wells, A. (1999):
Egf Receptor.
Rev. of Int J Biochem Cell Biol 31.6: 637-43.

82. Zbaren, P., and Lehmann, W. (1987):
Frequency and Sites of Distant Metastases in Head and Neck Squamous Cell
Carcinoma. An Analysis of 101 Cases at Autopsy.
Rev. of Arch Otolaryngol Head Neck Surg 113.7: 762-4.

7 Materialnachweis

7.1 Chemikalien

Agarose, Biorad

Albumin, Bovine, Sigma

Anti-EGF-Receptor, Upstate, Cat06-129

Anti-rabbit Ig, Amersham, NA934

Anti-Beta-Actin, Sigma, A5441

Chloroform, Merck

Cisplatin (Platinex-Lsg.), Bristol

Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, 2951

DNA-Mass Ladder, Gibco BRL, Cat1008-013

ECL western blotting detection reagents, Amersham, RPN 2107

Eosin-Tyrode Lösung 0.25%, Apotheke des Universitätsklinikums Essen

Essigsäure 99.8%, J.T. Baker

Ethidiumbromid, Serva

Fetales Kälberserum 10%, Seromed SO115

5-Fluorouracil, Sigma

Glucosteril 5%, Fresenius

Glutamin Trockensubstanz 20mM, Seromed, K0281

Hybold ECL-Nitrozellulose, RPN 2020P, Amersham

Isopropanol, Apotheke des Universitätsklinikums Essen

Isotonische Natriumchloridlösung 0.9%, Delta-Pharma

Methanol, Merck

Natriumhydrogencarbonat 8.4%, Merck

Nicht essentielle Aminosäuren, Seromed, K0293

PBS Puffer ohne Calcium und Magnesiumzusätze pH 7.2, Apotheke des Universitätsklinikums Essen

Penicillin/Streptomycin 1000U/1000 microg/ml, Seromed, A2213

PMSF, Sigma

Rainbow-molecular-marker, Amersham, RPN 800

RNA PCR Kit, N808-0017 GeneAmp (Applied Biosystems)

RPMI-Medium 1640 ohne Glutamin, Seromed, F1215

SN-38, Rhone-Poulenc
Sulforhodamin, Sigma
Trichloressigsäure, Sigma
Tris, Boehringer Mannheim
Trypsin, Sigma
Tween 20, Sigma
ZD1839 (Gefitinib), Astra Zeneca

7.2 Laborgeräte

Heraeus Lamin Air flow system, Seriennummer 2448
Hettich Zentrifuge Rotanda 96
Hyperfilm ECL, Amersham 2230140615
Dynex Photometer für Mikrotiterplatten
Kulturflaschen Greiner, 50ml 690160, 250ml 658170, 550ml 660160
Laborröhrchen Greiner, 15ml 188271, 50ml 227261
Laufkammer WB, Biorad
Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen und Flachboden, Falcon 353014
Multichannelpipette mit 25microl, 50microl, 100microl Aufsätzen, Eppendorf, 4780
Nitrocellulose Membran, Amersham, RPN 303 D

8 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: EGFR- Dimer	10
Abbildung 2: ErbB-Rezeptorfamilie nach Harari et al. (34)	11
Abbildung 3: nach Prenzel et al. (2001) (60)	12
Abbildung 4: Strukturformel Gefitinib	19
Abbildung 5: Strukturformel Cisplatin	22
Abbildung 6: Strukturformel Carboplatin (Cyclobutancarbonsäurecisdiaminplatin) ..	23
Abbildung 7: Strukturformel 5-Fluorouracil	23
Abbildung 8: Strukturformel Paclitaxel	24
Abbildung 9: Strukturformel Irinotecan CPT-11	25
Abbildung 10: Strukturformel Sulforhodamin B ($C_{27}H_{29}N_2NaO_7S_2$)	28
Abbildung 11: Übersicht über den Ablauf des Immunoblottings	33
Abbildung 12: Übersicht über den Ablauf des Westernblot	35
Abbildung 13: Übersicht über die reverse Transkription	37
Abbildung 14: Übersicht über die RT-PCR	37
Abbildung 15: Übersicht über die Vorbehandlung der Zellen für die RT-PCR	39
Abbildung 16: Wachstumskinetik der Zelllinie A253	41
Abbildung 17: Zytotoxizitätskurve Cisplatin 33nM-333µM der Zelllinie A253	42
Abbildung 18: Zytotoxizitätskurve Carboplatin 33nM-333µM der Zelllinie A253	43
Abbildung 19: Zytotoxizitätskurve 5-Fluorouracil 1µM-333µM der Zelllinie A253	43
Abbildung 20: Zytotoxizitätskurve Irinotecan 0,1nM-0,33µM der Zelllinie A253	44
Abbildung 21: Zytotoxizitätskurve Paclitaxel 0,33nM-1µM der Zelllinie A253	44
Abbildung 22: Zytotoxizitätskurve Gefitinib 24h 0,033µM-100µM	45
Abbildung 23: Zytotoxizitätskurve Gefitinib 120h 33nM-33µM	46
Abbildung 24: IC_{50} der getesteten Zytostatika in µmol/l	46
Abbildung 25: Zytotoxizitätskurve Cisplatin der Zelllinie A253	47
Abbildung 26: Zytotoxizitätskurve Cisplatin $+1/4$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253 ..	48
Abbildung 27: Zytotoxizitätskurve Cisplatin $+1/8$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253 ..	48
Abbildung 28: Zytotoxizitätskurve Carboplatin der Zelllinie A253	49
Abbildung 29: Zytotoxizitätskurve Carboplatin $+1/4$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253	49
Abbildung 30: Zytotoxizitätskurve Carboplatin $+1/8$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253	50

Abbildung 31: Zytotoxizitätskurve 5-Fluorouracil der Zelllinie A253.....	50
Abbildung 32: Zytotoxizitätskurve 5-Fluorouracil + $\frac{1}{4}$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253	51
Abbildung 33: Zytotoxizitätskurve 5-Fluorouracil + $\frac{1}{8}$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253	51
Abbildung 34: Zytotoxizitätskurve Irinotecan der Zelllinie A253.....	52
Abbildung 35: Zytotoxizitätskurve Irinotecan + $\frac{1}{4}$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253	52
Abbildung 36: Zytotoxizitätskurve Irinotecan + $\frac{1}{8}$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253	53
Abbildung 37: Zytotoxizitätskurve Paclitaxel der Zelllinie A253 $\mu\text{mol/l}$	53
Abbildung 38: Zytotoxizitätskurve Paclitaxel + $\frac{1}{4}$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253	54
Abbildung 39: Zytotoxizitätskurve Paclitaxel + $\frac{1}{8}$ der IC_{50} Gefitinib der Zelllinie A253	54
Abbildung 40: IC_{50} der Kontrollplatten, $\frac{1}{4}$ IC_{50} und $\frac{1}{8}$ IC_{50} in $\mu\text{mol/l}$ der Zelllinie A253	55
Abbildung 41: Westernblotergebnisse β -Aktin	56
Abbildung 42: Westernblotergebnisse EGFR	57
Abbildung 43: RT-PCR-Ergebnisse β -Actin	58
Abbildung 44: RT-PCR-Ergebnisse EGFR	59

9 Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. U. Vanhoefer und seinem Team für die Unterstützung beim experimentellen und schriftlichen Teil der Dissertation. Besonders ist auch das Laborteam hervorzuheben. Vielen Dank für die unermüdlichen Erklärungen zum Material und zur Versuchsdurchführung.

Vielen Dank an meine Freunde und Familie, die zum Teil trotz Verständnisproblemen wegen Fachfremdheit immer wieder Anregungen gegeben haben und außerdem versucht haben diese Arbeit frei von Rechtschreibfehlern zu bekommen. Danke, das war ein wirklich großer Einsatz. Zuletzt noch vielen Dank an meinem Freund Dirk der mich durch die Irrungen und Wirrungen der Formatierung geführt hat.

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Caroline Christianne Eggemann
Wohnort: Bern (CH)
Geburtsdatum: 1. Juli 1977
Geburtsort: Immenstadt im Allgäu (D)
Nationalität: deutsch

Berufliche Tätigkeit

Assistenz:

03.2005 – heute Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe in der Frauenklinik der Universität Bern (CH)
01.2004 – 01.2005 Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe im Kt. Spital Sursee-Wolhusen in Wolhusen (CH)

Ausbildung:

2004 A-Diplom für Akupunktur (CAN)
2004 Grundkurs Grundlagen der geburtshilflichen Sonographie für Anfänger
08.2003 Abschluss des Studiums für Humanmedizin mit dem dritten Staatsexamen an der Universität Essen (D)
10.02-10.03 Praktisches Jahr:
 10.02–02.03 Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Kantonsspital Thun (CH)
 02.03-06.03 Abteilung für Chirurgie im Zieglerspital Bern (CH)
 06.03-10.03 Abteilung für Innere Medizin im Universitätsklinikum Essen (D)
2002 Abschluss des zweiten klinischen Abschnitts mit dem zweiten Staatsexamen an der Universität Essen (D)
2001 - 2002 Zellexperimenteller Teil der Doktorarbeit über "Präklinische Evaluation des EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors „Gefitinib“ an der A253-Zelllinie aus dem Bereich der Kopf-

	und Halstumoren“ in der Tumorklink des Uniklinikums Essen (D) unter der Leitung von Privatdozent Dr. Udo Vanhoefer
1999	Abschluss des ersten klinischen Abschnitts mit dem ersten Staatsexamen an der Universität Essen (D)
1998	Abschluss des vorklinischen Abschnitts mit der ärztlichen Vorprüfung an der Universität Essen (D)
1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin am Universitätsklinikum Essen (D)
1996	Abitur am Goerdelergymnasium Paderborn (D)

Studienbegleitende Tätigkeiten:

1997 - 2002	Stelle im pflegerischen Bereich des chirurgischen Notfalls im Bethesdakrankenhaus Essen (D)
1998 - 2001	Lehrtätigkeit im Fach Biochemie an der dem Universitätsklinikum in Essen (D) angeschlossenen Diätassistentinnenschule